



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

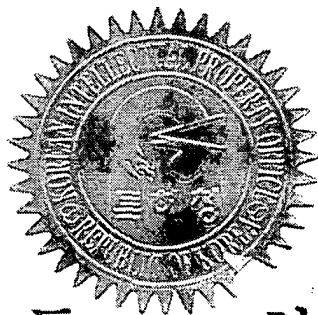
This is to certify that the following application annexed hereto is a true copy from the records of the Korean Intellectual Property Office.

출원번호 : 10-2004-0021601
Application Number

출원년월일 : 2004년 03월 30일
Filing Date

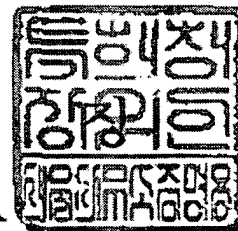
출원인 : 윤채옥 외 1명
Applicant(s) YUN CHAE OK, et al.

2010년 01월 06일



특허청

COMMISSIONER



출원번호: 10-2004-0021601

【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2004.03.30
【발명의 국문명칭】	릴랙신 유전자를 포함하는 유전자 전달 시스템 및 릴랙신을 이용한 약제학적 조성물
【발명의 영문명칭】	Gene Delivery System Containing Relaxin Gene and Pharmaceutical Composition Using Relaxin
【출원인】	
【성명】	윤채옥
【출원인코드】	4-2001-035698-5
【출원인】	
【성명】	김주향
【출원인코드】	4-2001-035697-9
【대리인】	
【명칭】	특허법인세신
【대리인코드】	9-2001-100004-2
【지정된변리사】	최홍순, 김경철, 양부현
【포괄위임등록번호】	2001-057898-6
【포괄위임등록번호】	2001-057897-9
【발명자】	
【성명】	윤채옥

출원번호: 10-2004-0021601

【출원인코드】 4-2001-035698-5

【발명자】

【성명】 김주향

【출원인코드】 4-2001-035697-9

【심사청구】 청구

【미생물기탁】

【기탁기관명】 한국미생물보존센터

【수탁번호】 KCCM-10566

【수탁일자】 2004.03.19

【미생물기탁】

【기탁기관명】 한국미생물보존센터

【수탁번호】 KCCM-10567

【수탁일자】 2004.03.19

【취지】 특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사를 청구합니다.

대리인

특허법인세신 (인)

【수수료】

【기본출원료】 72 면 38,000 원

【가산출원료】 0 면 0 원

【우선권주장료】 0 건 0 원

【심사청구료】 15 항 589,000 원

【합계】 627,000 원

출원번호: 10-2004-0021601

【감면사유】 개인(70%감면)

【감면후 수수료】 188,100 원

【첨부서류】 1.미생물기탁증명서_2통

【요약서】

【요약】

본 발명은 릴랙신 (relaxin)-인코딩 뉴클레오타이드 서열을 추가적으로 포함하며 상기 릴랙신은 상기 목적 뉴클레오타이드 서열의 세포내 운반 효율을 증가시키는 작용을 하는 것을 특징으로 하는 유전자 전달 시스템, 릴랙신-인코딩 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 재조합 아데노바이러스, 이를 포함하는 항종양 억제학적 조성물, 개선된 조직 침투성을 갖는 억제학적 조성물 및 세포외기질의 과도한 축적-관련 질환 또는 상태의 치료용 억제학적 조성물에 관한 것이다.

【대표도】

도 6b

【색인어】

릴랙신, 유전자 전달 시스템, 아데노바이러스, 종양, 암, 세포고사, 세포외기질, 섬유증

【명세서】

【발명의 명칭】

릴랙신 유전자를 포함하는 유전자 전달 시스템 및 릴랙신을 이용한 약제학적 조성물{Gene Delivery System Containing Relaxin Gene and Pharmaceutical Composition Using Relaxin}

【도면의 간단한 설명】

- <1> 도 1은 실시예에서 이용된 재조합 아데노바이러스의 유전자 지도를 나타낸다.
- <2> 도 2는 릴랙신을 발현하는 본 발명의 재조합 아데노바이러스의 릴랙신 발현 양상을 보여주는 그래프이다.
- <3> 도 3a-3d는 본 발명의 릴랙신 유전자-포함 아데노바이러스의 인 비트로 종양 조직 침투성을 보여주는 사진이다. 도 3a-3d는 각각 U343, U87MG, C33A 및 A549에 대한 침투성을 보여준다.
- <4> 도 4a-4e는 본 발명의 릴랙신 유전자-포함 아데노바이러스의 인 비보 종양 조직 침투성을 보여주는 사진이다. 도 4a-4e는 각각 U343, U87MG, C33A, Hep3B 및 A549에 대한 침투성을 보여준다.
- <5> 도 5는 본 발명의 릴랙신 유전자-포함 재조합 아데노바이러스의 세포 살상능을 검증하는 CPE (cytopathy effect) 분석 사진이다.

출원번호: 10-2004-0021601

<6> 도 6a-6b는 본 발명의 재조합 아데노바이러스의 플라크 형성능을 보여주는 사진 및 그래프이다.

<7> 도 7은 본 발명의 재조합 아데노바이러스의 세포고사 유도능을 검증하기 위하여, subG₁ 세포군의 증가율을 시험한 유세포 분석기의 결과이다.

<8> 도 8은 본 발명의 재조합 아데노바이러스의 세포고사 유도능을 검증하기 위하여, Annexin-V와 PI로 이중염색하여 실시한 유세포 분석기의 결과이다.

<9> 도 9는 본 발명의 재조합 아데노바이러스의 세포고사 유도능을 검증하기 위하여, DNA 절편화를 확인한 튜넬 분석 결과를 보여주는 사진이다.

<10> 도 10a-10b는 릴렉신을 발현하는 본 발명의 재조합 아데노바이러스가 생체 내에서 발휘하는 항종양 효능을 검증한 실험 결과이다.

<11> 도 11은 릴렉신을 발현하는 본 발명의 재조합 아데노바이러스를 투여한 생쥐에서 종양의 변화를 보여주는 사진이다.

<12> 도 12는 본 발명의 재조합 아데노바이러스가 투여된 생쥐에서 종양내 콜라겐 분포를 보여주는 사진이다.

<13> 도 13은 본 발명의 재조합 아데노바이러스에 의해 발현되는 릴렉신 발현에 의한 세포외기질의 감소가 MMP (matrix metalloprotease) 발현에 의해서 유도되는 것인지를 확인한 젤 사진이다.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<14> 본 발명은 유전자 전달 시스템 및 재조합 아데노바이러스에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 틸렉신 유전자를 포함하는 유전자 전달 시스템, 재조합 아데노바이러스 및 상기 재조합 아데노바이러스를 포함하는 항종양 억제학적 조성물, 개선된 조직 침투성을 갖는 억제학적 조성물 및 세포외기질의 과도한 축적-관여 질병 또는 질환의 치료용 억제학적 조성물에 관한 것이다.

<15> 유전자 치료는 외래의 유전자를 세포 또는 조직에 이입시켜 병적 상태를 치료하는 것이다. 낫세포증, α_1 항트립신 결핍증, 페닐케톤뇨증, 혈우병 및 낭포성 섬유증과 같은 유전병에서, 유전자 치료의 목표는 결핍 유전자를 대체하여 세포 또는 조직이 정상적으로 기능하도록 하는 것이다. 또한 유전자 치료는 비정상적 세포를 제거하는 데에도 이용된다. 암, 염증과 자가면역 질환과 같은 병적 상태에서, 유전자 치료는 타겟 비정상 세포의 사멸을 야기하는 유전자를 이입하여 이들 질병의 치료를 가능하게 한다.

<16> 이와 같은 유전자 치료의 가능성에도 불구하고, 세포 또는 조직으로의 유전자의 불충분한 전달은 유전자 치료의 중요한 장애요인이다. 예컨대, 레트로바이러스, 아데노바이러스 또는 아데노-관련 바이러스 (Adeno-associated viruses: AAV)를 이용한 유전자 전달에 대한 많은 연구가 이루어졌으나, 실제로 개체 수준에 적용되었을 때 또는 특정 조직 (예: 종양 조직)에 적용되었을 때에는 충분한 유전

출원번호: 10-2004-0021601

자 전달 효율을 나타내지 못하게 되어 유전자치료의 효용성을 떨어뜨리고 있다.

<17> 따라서, 현재 개발된 유전자 전달 시스템보다 개선된 유전자 전달 효율을 나타내는 새로운 유전자 전달 방법의 개발은 성공적인 유전자치료를 위해서 절대적으로 필요하다.

<18> 한편, 아데노바이러스를 이용한 초기의 유전자 치료는 아데노바이러스의 복제에 필수적인 E1 유전자 대신에 치료용 유전자를 삽입한 복제 불능 아데노바이러스를 주로 이용하였는데, 이들 아데노바이러스는 감염된 세포들과 그 주변에서만 제한적으로 항종양 효과를 유도하여 임상적인 실용성 측면에서 많은 제약이 있었다.

<19> 이를 극복하기 위한 한 방안으로 암세포에서만 선택적으로 증식하여 암세포를 살상하는 종양 특이적 살상 아데노바이러스인 ONYX-015(d11520)가 개발되었다.

ONYX-015는 E1B 55 kDa 유전자가 부분적으로 결손된 아데노바이러스로 p53이 기능적으로 비활성화된 세포에서만 증식이 가능하다. 즉, 정상세포에서는 ONYX-015 아데노바이러스가 p53을 비활성화 할 수 없어 바이러스의 증식이 억제되어 세포살상을 유도할 수 없는 반면에, p53의 기능이 억제되어 있는 암세포에서는 바이러스의 증식이 활발하게 일어나게 되어 궁극적으로 암세포만을 선택적으로 살상하게 된다 (Chang, F., et al., *J Clin Oncol* 13:1009-22(1995)).

<20> 최근 두경부암을 대상으로 진행된 phase-II/III 임상시험 결과, 종양 특이적 살상 아데노바이러스의 우수한 치료효과가 보고된 바 있다 (Kirn, D., et al., *Nat Med* 4:1341-2(1998); Nemunaitis, J. et al., *Cancer Res* 60:6359-66(2000); 및

출원번호: 10-2004-0021601

Ganly, I. et al., *Clin Cancer Res* 6:798-806(2000)). 하지만 이들 바이러스의 투여로 두경부 종양의 성장이 부분적으로 억제되긴 하였으나 완전히 소멸되지 못하였고, 일정기간이 지난 후에는 다시 종양의 성장이 빠르게 진행되었다.

<21> 이러한 결과는 국소적으로 종양내 투여된 아데노바이러스가 일부 주변으로만 확산되고 종양 조직 전체에 퍼지지 못해서 항종양 효과가 제한적으로 유도되어 바이러스에 감염되지 않은 종양 세포가 다시 빠르게 성장하였기 때문으로 생각된다.

최근의 한 연구 보고에 따르면, 누드 생쥐에 형성된 인체 종양내에 투여된 아데노바이러스는 바이러스 투여 후 100일이 지난 경우에도 종양내에서 복제가 일어났으며 종양조직으로부터 살아있는 바이러스를 추출할 수 있었음에도 불구하고 종양을 완전히 소멸시키지는 못하였다 (Sauthoff, H. et al., *Human Gene Therapy* 14:425-433(2003)).

<22> 따라서, 이상적인 종양 특이적 살상 아데노바이러스는 강력한 세포 살상능을 유도할 수 있을 뿐만 아니라 투여된 아데노바이러스가 종양 조직 전체에 잘 확산되어 주변 암세포들을 효율적으로 감염할 수 있어야 한다.

<23> 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 특허문헌 및 논문이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 특허문헌 및 논문의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

출원번호: 10-2004-0021601
(homologues)를 포함한다.

<35> 본 발명에서 유전자 전달 효율을 개선하는 릴랙신은 (Relaxin: RLX)은 인슐린과 인슐린-유사 성장 인자 (IGF) 부류에 속하는 6 kDa의 펩타이드 호르몬으로 알려져 있는 것으로서, 주로 황체 (corpus luteum)와 자궁내막 (endometrium)에서 만 들어지며 임신기간 동안에 혈장 내 농도가 크게 증가한다 (Sherwood, O. D., et al., Dynamic changes of multiple forms of serum immunoactive relaxin during pregnancy in the rat. *Endocrinology* 114:806-13(1984)). 초기 연구 결과에서 릴랙신은 임신기간 동안에만 생식기관에서 활성을 나타낸다고 보고되어 "임신 호르몬"으로 분류되다가, 최근의 연구 결과에서 릴랙신은 생식기관외 다른 조직에서도 생물학적 활성을 나타낸다고 보고되어 "마스터 호르몬"으로 분류되고 있다 (Hisaw, F. L., et al., Effects of relaxin on the endothelium of endometrial blood vessels in monkeys (*Macaca mulatta*). *Endocrinology* 81:375-85(1967)).

<36> 릴랙신은 임신 호르몬으로 불려지는 명칭에 맞게 태반과 자궁의 성장과 재생을 촉진하며, 자궁경부 (uterine cervix)를 부드럽게 하여 분만시 산도를 넓혀주는 기능을 한다. 이는 산도 조직에서 MMP2, MMP3 및 MMP9 등과 같은 여러 종류의 MMP의 발현을 촉진하여 콜라겐을 분해하고 결체조직, 더 나아가 기저막까지도 파괴하여 산도 세포 외 기질의 분해를 유도 할 수 있기 때문이다. 뿐만 아니라 폐, 심장, 피부, 유두, 소장, 유선, 혈관과 정관에서도 릴랙신에 의한 MMP1과 MMP3의 촉진이 관찰되었으며, 이들 조직들에서 릴랙신은 콜라겐의 과발현을 막는 억제제로 작용한다고 보고되었다 (Qin, X., et al., *Biol Reprod* 56:800-11(1997); Qin, X.,

출원번호: 10-2004-0021601

et al., *Biol Reprod* 56:812-20(1997); 및 Palejwala, S. et al., *Endocrinology* 142:3405-13(2001)).

<37> 본 발명의 유전자 전달 시스템에서 릴렉신이 유전자 전달 효율을 증가시키는 기전 중 하나는, 릴렉신이 MMP2, MMP3 및 MMP9 등과 같은 여러 종류의 MMP 발현을 촉진함으로써 세포들을 둘러싸고 있는 세포외기질 성분의 대부분을 차지하고 있는 콜라겐을 분해하고, 결합조직 더 나아가 기저막까지도 파괴하여 세포외기질의 분해를 유도할 수 있기 때문으로 판단되며, 이러한 기전은 하기의 실시예에 의해 검증된다.

<38> 따라서, 상술한 릴렉신의 작용을 참조하면, 본 발명의 유전자 전달 시스템은 세포외기질로 연결된 세포들로 이루어진 조직내의 세포에서 그 장점이 두드러지게 나타난다. 특히, 결합조직에 의해 보다 견고하게 둘러싸여 있는 종양조직에 본 발명의 유전자 전달 시스템이 적용되면, 종래의 어떠한 전달체 보다 개선된 전달 효율을 나타낸다.

<39> 본 발명의 유전자 전달 시스템을 제조하기 위해, 릴렉신-인코딩 뉴클레오타이드 서열은 적합한 발현 컨스트럭트 (expression construct) 내에 존재하는 것이 바람직하다. 상기 발현 컨스트럭트에서, 릴렉신 유전자는 프로모터에 작동적으로 연결되는 것이 바람직하다. 본 명세서에서, 용어 "작동적으로 결합된"은 핵산 발현 조절 서열 (예: 프로모터, 시그널 서열, 또는 전사조절인자 결합 위치의 어레이)과 다른 핵산 서열사이의 기능적인 결합을 의미하며, 이에 의해 상기 조절 서열은 상기 다른 핵산 서열의 전사 및/또는 해독을 조절하게 된다. 본 발명에

출원번호: 10-2004-0021601

종양을 퇴화시키는 암 치료 유전자로서, 종양 억제 유전자, 면역 조절 유전자 [예: 사이토카인 유전자, 케모카인 유전자 및 조자극 인자 (costimulatory factor: B7.1 과 B7.2와 같은 T 세포 활성화에 필요한 보조 분자)], 항원성 유전자, 자살 유전자, 세포독성 유전자, 세포증식 억제 유전자, 친-세포사멸 유전자 및 항-신생 혈관 생성 유전자가 포함되며 이에 한정되는 것은 아니다.

<44>

자살 유전자는 세포가 외부 인자에 의해 살상되기 쉽도록 유도하는 물질을 발현하거나 세포에 독성 조건을 유발하는 핵산 서열이다. 이러한 자살 유전자로 잘 알려진 것은 티미딘 키나제(TK) 유전자이다 (미국특허 제5,631,236호 및 제 5,601,818호). TK 유전자 산물을 발현하는 세포는 간사이클로비르 (gancyclovir)의 투여에 의해 선택적인 사멸에 민감하다. 종양 억제 유전자는 종양의 형성을 억제하는 폴리펩타이드를 암호화하는 유전자를 가리킨다. 종양 억제 유전자는 포유동물에서 자연발생 유전자이며, 이 유전자의 결실 또는 불활성화는 종양 발생에 필수 전제인 것으로 믿어지고 있다. 종양 억제 유전자의 예로는 APC, DPC4, NF-1, NF-2, MTS1, WT1, BRCA1, BRCA2, VHL, p53, Rb, MMAC-1, MMSC-2, 망막아세포종 유전자 (Lee et al. *Nature*, 329:642(1987)), 선종양 폴립증 장 단백질 (adenomatous polyposis coli protein; 미국특허 제 5,783,666 호), 염색체 3p21.3에 위치한 비인후 종양 억제인자 유전자 (Cheng et al. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 95:3042-3047(1998)), 결손된 결장 종양 (DCC) 유전자, MTS1, CDK4, VHL, p110Rb, p16 및 p21을 포함한 종양 억제 유전자의 INK4 계열의 일원 및 이의 치료학적으로 유효한 단편 (예, p56Rb, p94Rb 등)이 포함된다. 당업자는 상기 예시된 유전자

출원번호: 10-2004-0021601

외에 기타 알려진 항종양 유전자 모두가 본 발명에 사용될 수 있다는 것을 이해할 것이다.

<45> 본 명세서에서 용어 "항원성 유전자 (antigenic gene)"는 표적 세포내에서 발현되어 면역 시스템에서 인식할 수 있는 세포표면 항원성 단백질을 생산하는 뉴클레오타이드 서열을 의미한다. 이러한 항원성 유전자의 예에는 암태아성 항원 (carcinoembryonic antigen, CEA) 및 PSA (prostate specific antigen), AFP (α -feto protein), p53 (WO 94/02167)이 포함된다. 면역 시스템이 용이하게 인식하도록 하기 위해, 상기 항원성 유전자를 MHC 제 I 형 항원에 결합시킬 수 있다.

<46> 본 명세서에서 용어 "세포독성 유전자 (cytotoxic gene)"는 세포내에서 발현되어 독성 효과를 나타내는 뉴클레오타이드 서열을 의미한다. 이러한 세포독성 유전자의 예에는 슈도모나스 외독소 (exotoxin), 리신 독소, 디프테리아 독소 등을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열이 포함된다.

<47> 본 명세서에서 용어 "세포증식 억제 유전자 (cytostatic gene)"는 세포내에서 발현되어 세포 주기 도중에 세포 주기를 정지시키는 뉴클레오타이드 서열을 의미한다. 이러한 세포증식 억제 유전자의 예에는 p21, 망막아세포종 유전자, E2F-Rb 융합 단백질 유전자, 사이클린-종속성 키나아제 억제인자를 코딩하는 유전자 (예를 들면, p16, p15, p18 및 p19), 성장 중지 특이성 호메오박스 (growth arrest specific homeobox, GAX) 유전자 (WO 97/16459 및 WO 96/30385) 등이 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다.

<48> 또한, 각종 질환을 치료하는데 유용하게 사용될 수 있는 많은 치료 유전자도

출원번호: 10-2004-0021601

본 발명의 시스템에 의해 운반된다. 예를 들면, 사이토카인 (예, 인터페론-알파, -베타, -델타 및 -감마), 인터루킨 (예, IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, IL-19 및 IL-20) 및 콜로니 자극 인자 (예, GM-CSF 및 G-CSF)를 암호화하는 유전자, 케모카인 그룹 (단핵구 화학 주성단백질 1 (MCP-1), 단핵구 화학 주성 단백질 2 (MCP-2), 단핵구 화학 주성단백질 3 (MCP-3), 단핵구 화학 주성 단백질 4 (MCP-4), 대식구 염증성 단백질 1 α (MIP-1 α), 대식구 염증성 단백질 1 β (MIP-1 β), 대식구 염증성 단백질 1 γ (MIP-1 γ), 대식구 염증성 단백질 3 α (MIP-3 α), 대식구 염증성 단백질 3 β (MIP-3 β), 케모카인 (ELC), 대식구 염증성 단백질 4 (MIP-4), 대식구 염증성 단백질 5 (MIP-5), LD78 β , RANTES, SIS-엡실론 (p500), 흥선 활성화-조절되는 케모카인 (TARC), 에오타신, I-309, 인간 단백질 HCC-1/NCC-2, 인간 단백질 HCC-3, 마우스 단백질 C10 등)이 포함된다. 또한, 조직 플라스미노겐 활성화제(tPA) 또는 우로키나제를 발현하는 유전자 및 지속적인 혈전 효과를 제공하여 콜레스테롤 과다혈증을 예방하는 LAL 생성 유전자가 포함된다. 또한, 낭성 섬유증, 아데노신 데아미나제 결핍증 및 AIDS와 같은 바이러스, 악성 및 염증 질환 및 상태를 치료하기 위한 많은 폴리뉴클레오타이드가 알려져 있다.

<49> 본 명세서에서 용어 "친-세포사멸 유전자 (pro-apoptotic gene)"는 발현되어 프로그램된 세포 소멸을 유도하는 뉴클레오타이드 서열을 의미한다. 이러한 친-세포사멸 유전자의 예에는 p53, 아데노바이러스 E3-11.6K (Ad2 및 Ad5에서 유래) 또는 아데노바이러스 E3-10.5K (Ad에서 유래), 아데노바이러스 E4 유전자, Fas 리간드, TNF-, TRAIL, p53 경로 유전자 및 카스파아제를 코딩하는 유전자가 포함된다.

출원번호: 10-2004-0021601

<50> 본 발명의 명세서에서 용어 "항-신생혈관생성 유전자 (anti-angiogenic gene)"는 발현되어 항-신생혈관 생성 인자를 세포밖으로 방출하는 뉴클레오타이드 서열을 의미한다. 항-신생혈관 생성 인자에는, 안지오테틴, Tie 2 (PNAS, 1998, 95,8795-800)와 같은 혈관 내피 성장 인자 (VEGF)의 억제 인자, 엔도스테틴 등이 포함된다.

<51> 상술한 목적의 뉴클레오타이드 서열은 GenBank 또는 EMBL과 같은 DNA 서열 데이터뱅크로부터 입수할 수 있다.

<52> 본 발명의 유전자 전달 시스템은 다양한 형태로 제작할 수 있는 데, 이는 (i) 내이키드 (naked) 재조합 DNA 분자, (ii) 플라스미드, (iii) 바이러스 벡터, 그리고, (iv) 상기 내이키드 재조합 DNA 분자 또는 플라스미드를 내포하는 리포솜 또는 니오솜의 형태로 제작할 수 있다.

<53> 릴렉신-인코딩 뉴클레오타이드 서열은 통상적인 유전자 치료에 이용되는 모든 유전자 전달 시스템에 적용될 수 있으며, 바람직하게는 플라스미드, 아데노바이러스 (Lockett LJ, et al., *Clin. Cancer Res.* 3:2075-2080(1997)), 아데노-관련 바이러스 (Adeno-associated viruses: AAV, Lashford LS., et al., *Gene Therapy Technologies, Applications and Regulations* Ed. A. Meager, 1999), 레트로바이러스 (Gunzburg WH, et al., *Retroviral vectors. Gene Therapy Technologies, Applications and Regulations* Ed. A. Meager, 1999), 렌티바이러스 (Wang G. et al., *J. Clin. Invest.* 104(11):R55-62(1999)), 헤르페스 심플렉스 바이러스 (Chamber R., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 92:1411-1415(1995)), 배시니아

출원번호: 10-2004-0021601

바이러스 (Puhlmann M. et al., *Human Gene Therapy* 10:649-657(1999)), 리포솜 (Methods in Molecular Biology, Vol 199, S.C. Basu and M. Basu (Eds.), Human Press 2002) 또는 니오솜에 적용될 수 있다. 가장 바람직하게는, 본 발명의 유전자 전달 시스템은 릴렉신-인코딩 뉴클레오타이드 서열을 아데노바이러스에 적용하여 제조된다.

<54> i. 아데노바이러스

<55> 아데노바이러스는 중간 정도의 지놈 크기, 조작의 편의성, 높은 타이터, 광범위한 타깃세포 및 우수한 감염성 때문에 유전자 전달 벡터로서 많이 이용되고 있다. 지놈의 양 말단은 100-200 bp의 ITR (inverted terminal repeat)를 포함하며, 이는 DNA 복제 및 패키징에 필수적인 시스 엘리먼트이다. 지놈의 E1 영역 (E1A 및 E1B)은 전사 및 숙주 세포 유전자의 전사를 조절하는 단백질을 코딩한다. E2 영역 (E2A 및 E2B)은 바이러스 DNA 복제에 관여하는 단백질을 코딩한다.

<56> 현재 개발된 아데노바이러스 벡터 중에서, E1 영역이 결여된 복제 불능 아데노바이러스가 많이 이용되고 있다. 한편, E3 영역은 통상적인 아데노바이러스 벡터에서 제거되어 외래 유전자가 삽입되는 자리를 제공한다 (Thimmappaya, B. et al., *Cell*, 31:543-551(1982); 및 Riordan, J. R. et al., *Science*, 245:1066-1073(1989)). 따라서, 본 발명의 릴렉신 유전자는 결실된 E1 영역 (E1A 영역 및/또는 E1B 영역, 바람직하게는 E1B 영역) 또는 E3 영역에 삽입되는 것이

출원번호: 10-2004-0021601

키징 세포주를 구축한다 (Mann et al., *Cell*, 33:153-159(1983)). 틸락신 유전자, 운반하고자 하는 목적 뉴클레오타이드 서열, LTR 및 Ψ 서열을 포함하는 재조합 플라스미드를 상기 세포주에 이입하면, Ψ 서열은 재조합 플라스미드의 RNA 전사체의 생산을 가능하게 하며, 이 전사체는 바이러스로 패키징되고, 바이러스는 배지로 배출된다 (Nicolas and Rubinstein "Retroviral vectors," In: *Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses*, Rodriguez and Denhardt (eds.), Stoneham: Butterworth, 494-513(1988)). 재조합 레트로바이러스를 함유하는 배지를 수집하고 농축하여 유전자 전달 시스템으로 이용한다.

<64> 2세대 레트로바이러스 벡터를 이용한 유전자 전달이 발표되었다. Kasahara et al. *Science*, 266:1373-1376(1994))는 몰로니 뮤라인 류케미아 바이러스의 변이체를 제조하였고, 여기에서 EPO (erythropoietin) 서열을 엔벨로프 부위에 삽입하여 새로운 결합 특성을 갖는 키메라 단백질을 생산하였다. 본 발명의 유전자 전달 시스템도 이와 같은 2세대 레트로바이러스 벡터의 구축 전략에 따라 제조할 수 있다.

<65> iii. AAV 벡터

<66> 아데노-관련 바이러스 (AAV)는 비분열 세포를 감염시킬 수 있고, 다양한 종류의 세포에 감염할 수 있는 능력을 갖고 있기 때문에 본 발명의 유전자 전달 시스템으로 적합하다. AAV 벡터의 제조 및 용도에 대한 상세한 설명은 미국 특허 제 5,139,941 호 및 제 4,797,368 호에 상세하게 개시되어 있다.

출원번호: 10-2004-0021601

<67> 유전자 전달 시스템으로서의 AAV에 대한 연구는 LaFace et al, *Viology*, 162:483486(1988), Zhou et al., *Exp. Hematol.* (NY), 21:928-933(1993), Walsh et al, *J. Clin. Invest.*, 94:1440-1448(1994) 및 Flotte et al., *Gene Therapy*, 2:29-37(1995)에 개시되어 있다. 최근에, AAV 벡터는 낭포성 섬유증의 치료제로서 임상 I을 실시하고 있다.

<68> 전형적으로, AAV 바이러스는 두 개의 AAV 말단 리피트가 옆에 위치되어 있는 목적의 유전자 서열 (릴렉신 유전자 및 운반하고자 하는 목적 뉴클레오타이드 서열)을 포함하는 플라스미드 (McLaughlin et al., *J. Virol.*, 62:1963-1973(1988); 및 Samulski et al., *J. Virol.*, 63:3822-3828(1989)) 및 말단 리피트가 없는 야생형 AAV 코딩 서열을 포함하는 발현 플라스미드 (McCarty et al., *J. Virol.*, 65:2936-2945(1991))를 동시형질전환시켜 제조된다.

<69> iv. 다른 바이러스 벡터

<70> 다른 바이러스 벡터들도 본 발명의 유전자 전달 시스템으로 이용할 수 있다. 배시니아 바이러스 (Puhlmann M. et al., *Human Gene Therapy* 10:649-657(1999); Ridgeway, "Mammalian expression vectors," In: *Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses*. Rodriguez and Denhardt, eds. Stoneham: Butterworth, 467-492(1988); Baichwal and Sugden, "Vectors for gene transfer derived from animal DNA viruses: Transient and stable expression of

출원번호: 10-2004-0021601

시스템을 세포를 포함하는 생시료 (biosample)에 접촉시키는 단계를 포함하는 유전자 전달 방법을 제공한다.

<74> 본 발명에서, 유전자 전달 시스템이 바이러스 벡터에 기초하여 제작된 경우에는, 상기 접촉시키는 단계는 당업계에 공지된 바이러스 감염 방법에 따라 실시된다. 바이러스 벡터를 이용한 숙주 세포의 감염은 상술한 인용문헌에 기재되어 있다.

<75> 본 발명에서 유전자 전달 시스템이 내이키드 (naked) 재조합 DNA 분자 또는 플라스미드인 경우에는, 미세 주입법 (Capecchi, M.R., *Cell*, 22:479(1980); 및 Harland와 Weintraub, *J. Cell Biol.* 101:1094-1099(1985)), 칼슘 포스페이트 침전법 (Graham, F.L. et al., *Virology*, 52:456(1973); 및 Chen과 Okayama, *Mol. Cell. Biol.* 7:2745-2752(1987)), 전기 천공법 (Neumann, E. et al., *EMBO J.*, 1:841(1982); 및 Tur-Kaspa et al., *Mol. Cell Biol.*, 6:716-718(1986)), 리포솜-매개 형질감염법 (Wong, T.K. et al., *Gene*, 10:87(1980); Nicolau 및 Sene, *Biochim. Biophys. Acta*, 721:185-190(1982); 및 Nicolau et al., *Methods Enzymol.*, 149:157-176(1987)), DEAE-덱스트란 처리법 (Gopal, *Mol. Cell Biol.*, 5:1188-1190(1985)), 및 유전자 밤바드먼트 (Yang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87:9568-9572(1990)) 방법에 의해 유전자를 세포내로 이입시킬 수 있다.

<76> 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 아데노바이러스의 ITR (inverted terminal repeat) 뉴클레오타이드 서열 및 릴랙신 (relaxin)-인코딩 뉴

출원번호: 10-2004-0021601

함하고, 릴랙신-인코딩 뉴클레오타이드 서열은 결실된 E3 영역에 삽입되어 있는 것이다.

<83> 본 발명의 가장 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 재조합 아데노바이러스는 "ITR-E1A- Δ E1B-프로모터-릴랙신 유전자-폴리 A 서열" 구조를 갖으며, 상기 "프로모터-릴랙신 유전자-폴리 A 서열"은 결실된 E3 영역에 삽입된 것이다.

<84> 본 발명의 재조합 아데노바이러스에서, 종래의 항종양 아데노바이러스의 국소적 종양 침투력이 크게 개선되며, 세포고사능도 크게 개선된다. 이와 같은 효과는 본 발명에서 이용된 릴랙신이 세포외기질을 효과적으로 분해하고, 세포고사능을 증가시키기 때문이며, 최종적으로 본 발명의 재조합 아데노바이러스는 크게 개선된 종양세포살상능을 보인다.

<85> 대부분의 종양 조직은 암세포들이 단순히 군집되어 있는 것이 아니라, 혈관과 정상 조직들이 함께 뒤엉켜있다. 특히, 암조직내에 존재하는 결체조직들은 단단하고 또한 암세포 외부 주위에 딱딱한 세포외기질이 형성되어 있기 때문에 바이러스뿐만 아니라 항암 치료제가 종양에 원활히 침투되지 못하여 항종양효과를 제대로 발휘하지 못하는 경우가 많다. 이러한 문제점들은, 릴랙신 유전자를 포함하는 본 발명의 재조합 아데노바이러스를 이용한 경우에 성공적으로 극복된다.

<86> 하기의 실시예에서 예증된 바와 같이, 릴랙신이 삽입된 아데노바이러스는 종양구 표면뿐만 아니라 종양구 안쪽까지 활발히 확산된다. 생체내 암조직에서도 릴랙신을 발현하는 본 발명의 아데노바이러스는 투여부위 (injection site, needle track)로부터 더 멀리 그리고 더 넓게 퍼져나간다. 릴랙신 발현에 따른 유전자



출원번호: 10-2004-0021601

<90>

재조합 아데노바이러스를 이용한 효과적인 항종양 효과를 유도하기 위해서는 빠른 속도로 성장하는 암세포에 비하여 보다 빠른 바이러스의 증식과 인접세포로의 확산을 통해 효과적인 세포 살상효과를 유발시킬 수 있어야 한다. 또한, 아데노 바이러스를 이용한 암 유전자 치료가 성공적으로 이루어지기 위해서는 높은 치료효과와 함께 안전성을 높이기 위한 방안이 개발되어야 한다. 본 발명에서 개발된 락틴 유전자-포함 재조합 아데노바이러스는 바이러스 조직내 확산 증대와 세포교사 촉진을 통해 항종양 효과가 현격히 증대되며, 특히 E1B 55 유전자가 소실된 경우에는, 암세포 특이적으로 세포살상능을 나타낸다. 이는 결과적으로 암치료에 필요한 바이러스 투여량을 감소시킬 수 있어 바이러스에 의한 생체내 독성과 면역 반응을 크게 줄일 수 있다.

<91>

본 발명의 조성물에 포함되는 재조합 아데노바이러스는 상술한 바와 같이, 다양한 종양 세포에 대하여 살상 효능을 나타내므로, 본 발명의 약제학적 조성물은 종양과 관련된 다양한 질병 또는 질환, 예컨대 위암, 폐암, 유방암, 난소암, 간암, 기관지암, 비인두암, 후두암, 췌장암, 방광암, 결장암 및 자궁경부암 등의 치료에 이용될 수 있다. 본 명세서에서 용어 "치료"는 (i) 종양 세포 형성의 예방; (ii) 종양 세포의 제거에 따른 종양과 관련된 질병 또는 질환의 억제; 및 (iii) 종양 세포의 제거에 따른 종양과 관련된 질병 또는 질환의 경감을 의미한다. 따라서, 본 명세서에서 용어 "치료학적 유효량"은 상기한 약리학적 효과를 달성하는 데 충분한 양을 의미한다.

<92>

본 발명의 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상

<95>

본 발명의 약제학적 조성물은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화 됨으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡셀제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

<96>

본 발명의 약제학적 조성물은 단독의 요법으로 이용될 수 있으나, 다른 통상적인 화학 요법 또는 방사 요법과 함께 이용될 수도 있으며, 이러한 병행 요법을 실시하는 경우에는 보다 효과적으로 암 치료를 할 수 있다. 본 발명의 조성물과 함께 이용될 수 있는 화학 요법제는 시스플라틴 (cisplatin), 카르보플라틴 (carboplatin), 프로카르바진 (procarbazine), 메클로레타민 (mechlorethamine), 시클로포스파미드 (cyclophosphamide), 이포스파미드 (ifosfamide), 멜팔란 (melphalan), 클로라부실 (chlorambucil), 비술판 (bisulfan), 니트로소우레아 (nitrosourea), 디악티노마이신 (dactinomycin), 다우노루비신 (daunorubicin), 독소루비신 (doxorubicin), 블레오마이신 (bleomycin), 플리코마이신 (plicomycin), 미토마이신 (mitomycin), 에토포시드 (etoposide), 탁목시펜 (tamoxifen), 택솔 (taxol), 트랜스플라티늄 (transplatinum), 5-플루오로우라실 (5-fluorouracil), 빈크리스틴 (vincristin), 빈블라스틴 (vinblastin) 및 메토크렉세이트 (methotrexate) 등을 포함한다. 본 발명의 조성물과 함께 이용될 수 있는 방사 요법은 X-선 조사 및 γ -선 조사 등이다.

<97> 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 (a) 약물의 조직 침투성을 개선하기 위한 릴랙신 단백질; 및 (b) 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 개선된 조직 침투성을 갖는 약제학적 조성물을 제공한다.

<98> 본 발명에서 이용되는 릴랙신 단백질은 천연 소스 (natural source)로부터 분리된 릴랙신 단백질 및 재조합 기술로 수득한 릴랙신 단백질을 포함하며, 세포외기질 분해 활성을 갖는 범위 내에서 상기 단백질의 단편도 포함한다.

<99> 본 발명의 조성물은 약물이 투여되기 전 또는 약물과 동시에 투여될 수 있다. 또한, 본 발명의 조성물은 약물을 추가적으로 포함할 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물은 약물이 적용되는 생체 조직의 세포외기질을 분해함으로써, 약물의 조직 침투성을 크게 개선하여, 약물의 약리학적 효과를 증가시킨다.

<100> 본 발명의 약제학적 조성물에서, 약제학적으로 허용되는 담체, 투여방법 및 제제화 방법 등은 상술한 항종양 약제학적 조성물의 내용이 적용된다. 특히, 본 발명의 약제학적 조성물은 비경구 투여가 바람직하며, 예컨대, 정맥내 투여, 복강내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 경피 투여 또는 조직내 직접 투여 (예: 두경부암 또는 유방암 종괴내로의 직접 투여)를 이용하여 투여할 수 있다. 일반적으로, 본 발명의 약제학적 조성물의 투여량은 0.0001-100 mg/kg이다.

<101> 본 발명의 조성물에 의해 조직 침투성이 개선되는 상기 약물은, 화학 약물 및 바이오 약물 (biodrug)을 포함하며, 바람직하게는 세포외기질에 의해 조직 침투

출원번호: 10-2004-0021601

성이 문제가 되는 약물, 예컨대, 상술한 암에 대한 화학요법제이다.

<102> 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 (a) 릴랙신 (relaxin)-인코딩 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 유전자 전달 시스템 또는 릴랙신 단백질의 치료학적 유효량; 및 (b) 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 세포외기질의 과도한 축적 (accumulation)-관여 질환 또는 상태 (condition)의 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.

<103> 본 발명의 약제학적 조성물은 생체 조직의 세포외기질을 효과적으로 분해하여, 세포외기질의 과도한 축적 또는 침착 (deposition)이 관여하는 질병 또는 질환을 치료할 수 있다. 본 명세서에서, 표현 "세포외기질의 과도한 축적"은 콜라겐, 라미닌, 피브로넥틴 및 프로티오글리칸과 같은 세포외기질 성분이, 조직 또는 기관 기능을 손상시켜 종국적으로 섬유증 질환을 초래할 정도로 침착된 것을 의미한다.

<104> 본 발명의 약제학적 조성물이 적용되는 세포외기질의 과도한 축적-관여 질환 또는 상태는, 섬유증 상태와 관련된 것으로서, 반흔, 간경변, 폐섬유증, 사구체신염, 성인 또는 급성 호흡곤란증, 간섬유증, 신장섬유증, 후심근경색섬유증, 섬유낭포성 질환, 섬유증압, 정맥폐색증 또는 신장간질섬유증을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

<105> 본 발명의 약제학적 조성물이 적용되는 반흔 (scar)은 상처, 화상 또는 수술에 의해 야기된 반흔 및 켈로이드와 같은 과도한 반흔이다.

출원번호: 10-2004-0021601

<106> 본 발명의 약제학적 조성물에서, 릴랙신 (relaxin)-인코딩 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 유전자 전달 시스템은 상술한 본 발명의 유전자 전달 시스템에 의해 설명된다. 한편, 본 발명의 약제학적 조성물에서 이용되는 릴랙신 단백질은 천연 소스 (natural source)로부터 분리된 릴랙신 단백질 및 재조합 기술로 수득한 릴랙신 단백질을 포함하며, 세포외기질 분해 활성을 갖는 범위 내에서 상기 단백질의 단편도 포함한다.

<107> 본 발명의 약제학적 조성물에서, 약제학적으로 허용되는 담체, 투여방법 및 제제화 방법 등은 상술한 항종양 약제학적 조성물의 내용이 적용된다. 특히, 본 발명의 약제학적 조성물이 반흔의 치료를 위해 이용되는 경우에는, 경피투여가 가장 적합하며, 연고, 젤, 크림, 액체, 스프레이, 패취 또는 로션의 제형으로 제조하는 것이 가장 바람직하다. 일반적으로, 본 발명의 약제학적 조성물의 1일 투여량은 0.001-100 mg/kg이다.

<108> 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

<109> 실시예

출원번호: 10-2004-0021601

바람직하고, 보다 바람직하게는 결실된 E3 영역에 삽입된다. 한편, 세포내로 운반하고자 하는 목적 뉴클레오타이드 서열은 결실된 E1 영역 (E1A 영역 및/또는 E1B 영역, 바람직하게는 E1B 영역) 또는 E3 영역에 삽입되는 것이 바람직하고, 보다 바람직하게는 결실된 E1 영역에 삽입된다. 또한, 상기 삽입 서열들은 결실된 E4 영역에도 삽입될 수 있다. 본 명세서에서 바이러스 지놈 서열과 관련하여 사용되는 용어, "결실"은 해당 서열이 완전히 결실된 것뿐만 아니라, 부분적으로 결실된 것도 포함하는 의미를 가진다.

<57> 본 발명의 가장 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 아데노바이러스 유전자 전달 시스템은 "프로모터-목적 뉴클레오타이드 서열-폴리 A 서열"와 "프로모터-릴랙신 유전자-폴리 A 서열"이 연결된 구조를 갖고, 상기 "프로모터-목적 뉴클레오타이드 서열-폴리 A 서열"은 결실된 E1 영역 (E1A 영역 및/또는 E1B 영역, 바람직하게는 E1B 영역) 또는 E3 영역, 바람직하게는 결실된 E1 영역에 삽입된 것이고, 상기 "프로모터-릴랙신 유전자-폴리 A 서열"은 결실된 E1 영역 (E1A 영역 및/또는 E1B 영역, 바람직하게는 E1B 영역) 또는 E3 영역, 바람직하게는 결실된 E3 영역에 삽입된 것이다. 또한, "프로모터-목적 뉴클레오타이드 서열-폴리 A 서열-IRES-릴랙신 유전자-폴리 A 서열"처럼 목적 뉴클레오타이드와 릴랙신 유전자가 IRES (internal ribosome entry site)에 의해 연결된 바이시스트론 (bicistronic) 발현 시스템에 의해서도 발현될 수 있다.

<58> 또한, 아데노바이러스는 야생형 지놈의 약 105%까지 패키징할 수 있기 때문에, 약 2 kb를 추가적으로 패키징할 수 있다 (Ghosh-Choudhury et al., *EMBO J.*,

출원번호: 10-2004-0021601

6:1733-1739(1987)). 따라서, 아데노바이러스에 삽입되는 상술한 외래 서열은 아데노바이러스의 지놈에 추가적으로 결합시킬 수도 있다.

<59> 아데노바이러스는 42개의 상이한 혈청형 및 A-F의 서브그룹을 갖는다. 이 중에서, 서브그룹 C에 속하는 아데노바이러스 타입 5가 본 발명의 아데노바이러스 벡터를 얻기 위한 가장 바람직한 출발물질이다. 아데노바이러스 타입 5에 대한 생화학적 및 유전적 정보는 잘 알려져 있다.

<60> 아데노바이러스에 의해 운반되는 외래 유전자는 에피솜과 동일한 방식으로 복제되며, 이에 숙주세포에 대해 유전적독성이 매우 낮다. 따라서, 본 발명의 아데노바이러스 유전자 전달 시스템을 이용한 유전자 치료가 매우 안전할 것으로 판단된다.

<61> ii. 레트로바이러스

<62> 레트로바이러스는 자신의 유전자를 숙주의 지놈으로 삽입시키고, 대량의 외래 유전 물질을 운반할 수 있으며, 감염시킬 수 있는 세포의 스펙트럼이 넓기 때문에 유전자 전달 벡터로서 많이 이용되고 있다.

<63> 레트로바이러스 벡터를 구축하기 위하여, 틸락신 유전자 및 운반하고자 하는 목적 뉴클레오타이드 서열은 레트로바이러스의 서열 대신에 레트로바이러스 지놈에 삽입되어 복제 불능의 바이러스를 생산한다. 바이리온을 생산하기 위하여; gag, pol 및 env 유전자를 포함하지만 LTR (long terminal repeat)와 Ψ 서열은 없는 패

출원번호: 10-2004-0021601

<110> 실험재료 및 실험방법

<111> 대상 세포주 및 세포 배양

<112> 실험에 사용된 세포주들은 인체 뇌암 세포주 (U343, U87MG), 자궁경부암 세포주(C33A), 간암 세포주(Hep3B), 폐암 세포주(A549), 그리고 아데노바이러스 초기 발현 유전자인 E1 부위가 숙주유전체내에 내재되어 있는 293 세포주이며, 모두 ATCC (American Type Culture Collection)에서 구입하였다. 모든 세포주들은 10%의 우태아혈청 (Gibco BRL)이 함유된 DMEM 배지 (Gibco BRL)를 배양액으로 항생제 페니실린/스트렙토마이신 (Gibco BRL)을 첨가하여 5% CO₂의 존재 하에 37℃ 항온 배양기에서 배양하였다.

<113> 재조합 아데노바이러스들의 제작, 생산 및 역가 산출

<114> LacZ 유전자를 표지 유전자로 발현하고 린락신 유전자를 발현하는 E1과 E3 유전자가 소실된 복제불능 아데노바이러스를 제작하기 위하여, 먼저 vmd1324Bst (스위스국의 Fribourgh 대학의 Verca 박사로부터 구입; Heider, H. et al., *Biotechniques*, 28(2):260-265, 268-270(2000))의 소실된 E1 부위에 표지 유전자 LacZ가 삽입된 바이러스 벡터인 pd1-LacZ를 제작하였다. 이를 위하여, 먼저 LacZ를 발현하는 pcDNA-hygro-LacZ (Invitrogen, Carlsbad, CA, 미국) 플라스미드로부터 CMV 프로모터, LacZ, 그리고 polA 부위를 *Hind*III와 *Nae*I으로 처리하여 분리한 다음 이를 E1 아데노바이러스 서플렉터인 p Δ E1sp1A에 삽입하여 p Δ E1sp1A/CMV-

출원번호: 10-2004-0021601

LacZ 셔틀벡터를 제작하였다. 제작된 p Δ E1sp1A/CMV-LacZ 셔틀벡터를 *Xmn*I 제한효소로 절단한 뒤 *Bst*BI 제한효소로 단일가닥이 된 아데노바이러스 vmd1324*Bst*BI과 함께 대장균 BJ5183 (Dr. Verca, University of Fribourg, 스위스)에서 동시 형질 전환시켜 유전자 상동재조합을 유도하여 pdl-LacZ 아데노바이러스를 제작하였다.

<115>

릴렉신 유전자를 발현하는 아데노바이러스를 제작하기 위해, pDNR-LIB-RLX (ATCC, # MGC-14599)을 *Sa*I와 *Hind*III 제한효소로 처리하여 얻어진 1 kb DNA 절편을 pCA14 벡터 (Microbix, Ontario, Canada)에 삽입시켜 pCA14-RLX 벡터를 제작하였다. 본 실험에서 이용되는 릴렉신 유전자의 서열은 Genbank accession No. BC005956에 개시되어 있다. 제작된 pCA14-RLX을 *Bgl*II 제한효소를 처리하여 릴렉신이 CMV (cytomegalovirus) 프로모터에 의하여 발현될 수 있는 CMV-RLX-pol A 발현 카세트를 잘라내고, 이를 아데노바이러스 E3 셔틀벡터인 pSP72 Δ E3 (Promega, Madison, WI, USA)에 삽입하여 pSP72 Δ E3-cRLX E3 셔틀벡터를 제작하였다. 제작된 pSP72 Δ E3-cRLX E3 셔틀벡터를 *Xmn*I 제한효소로 처리하여 단일가닥으로 만든 다음 토탈 벡터인 상기 pdl-LacZ와 함께 대장균 BJ5183 (Dr. Verca, University of Fribourg, 스위스)에서 동시 형질전환시켜 유전자 상동 재조합 (homologous recombination)을 유도하여 dl-LacZ-RLX (또는 dl-Z-RLX) 아데노바이러스 벡터를 제작하였다 (도 1). 상기 dl-Z-RLX 아데노바이러스는 기탁기관 한국미생물보존센터에 2004년 3월 19일자로 기탁하고, 기탁번호 KCCM-10567을 부여받았다.

<116>

릴렉신 유전자가 발현되는 복제가능 아데노바이러스를 제작하기 위해, 상기에서 제작된 pSP72 Δ E3-cRLX E3셔틀벡터를 *Xmn*I 제한효소로 처리하여 단일가닥으로

출원번호: 10-2004-0021601

<120> 인체 자궁암 세포주인 C33A에 dl-LacZ-RLX 또는 Ad- Δ E1B-RLX 아데노바이러스와 대조군으로서 dl-LacZ 또는 Ad- Δ E1B (KFCC-11288) 아데노바이러스를 각각 MOI (multiplicity of infection) 1-50으로 감염시키고 24 시간 후 세포로부터 배지를 회수하여 ELISA 키트 (Immune diagnostic, Benshem, Germany)를 이용하여 제조회사가 제시한 방법에 따라 림팩신의 ELISA 분석을 시행하였다.

<121> dl-LacZ-RLX 아데노바이러스의 종양구내 조직 침투성 검증

<122> 약 6-8주된 누드 생쥐의 복벽에 여러 종류의 인체 종양 세포주 (U343, U87MG, C33A 및 A549)를 피하 주사한 후 종양의 크기가 약 150-200 mm³ 정도 되었을 때 종양을 적출하였다. 적출된 종양은 약 1-2 mm 직경의 조각으로 잘라서 0.75% 아가로스가 코팅된 플레이트에서 5% 우태아혈청 (Gibco BRL)이 함유된 DMEM 배지 (GIBCO BRL)를 배양액으로 항생제 페니실린/스트렙토마이신 (Gibco BRL)을 첨가하여 5% CO₂의 존재하에 37°C 항온 배양기에서 배양하였다. 배양액은 일주일에 1-2회 교체하며 1주 이상 종양구를 배양하였다. 아데노바이러스를 감염시키기 전, 약 2 mm 정도의 직경을 가진 종양구를 0.75% 아가로스가 코팅된 48-웰 플레이트에 옮긴 다음 150 μ l의 DMEM 배지 (5% 우태아혈청)를 첨가하고, 바이러스를 1x10⁶, 1x10⁷ 및 1x10⁸ PFU로 배지에 첨가하였다. 바이러스 첨가 후 48 시간경에 배지를 제거하고 종양구를 고정 용액에 넣어 고정시킨 후 X-gal 염색을 실시하였다. 입

출원번호: 10-2004-0021601

체현미경을 이용하여 종양구 표면을 관찰하였으며, 종양구내로 아데노바이러스의 침투 정도를 확인하기 위해서는 먼저 X-gal 염색된 종양구를 O.C.T. compound (Sakura Finetec, Torrance, CA)로 동결 박편한뒤 8 μ m의 두께로 절단하여 젤라틴이 코팅된 슬라이드 글라스 위에 부착하여 관찰하였다.

<123> dl-LacZ-RLX 아데노바이러스의 생체내 암조직 침투성 검증

<124> 약 6-8주된 누드 생쥐의 복벽에 여러 종류의 인체 종양 세포주 (U343, U87MG, C33A, Hep3B 및 A549)를 피하 주사한 후 종양의 크기가 약 150-200 mm³ 정도 되었을 때 dl-LacZ-RLX 아데노바이러스를 5×10^7 - 1×10^8 PFU/50 μ l의 역가로 3회 종양내에 직접 주사하였다. 바이러스 투여 후 3 일경에 종양을 적출하여 4% 파라포름알데히드 용액에 넣은 뒤 4℃에서 4-8시간 동안 고정시킨 후 30% 수크로스 용액에서 12시간 정도 탈수 시켰다. 탈수된 조직은 O.C.T. compound (Sakura Finetec, Torrance, CA)로 동결 박편한 뒤 8 μ m의 두께로 절단하여 젤라틴이 코팅된 슬라이드 글라스 위에 부착하여 X-gal 염색을 실시하였다.

<125> Ad- Δ E1B-RLX 바이러스의 세포병변 효과 (CPE) 분석

<126> 락틴을 발현하는 아데노바이러스의 암세포에 대한 세포 살상능력을 검증하기 위하여 여러 종류의 인체 종양 세포주 (U343, U87MG, C33A, Hep3B 및 A549)를 24-웰 플레이트에 분주하고 24시간 후 Ad- Δ E1, Ad- Δ E1B, 또는 Ad- Δ E1B-RLX 아데

출원번호: 10-2004-0021601

노바이러스를 MOI 0.1-10 역가로 처리하였다. 세 종류의 바이러스 중 어느 한 바이러스가 0.1-0.5 MOI의 역가에서 감염세포를 완전히 사멸시킨 시점에 모든 배지를 제거하고 0.5% 크리스탈 바이올렛 (in 50% 메탄올)으로 잔존한 세포들을 고정시키고 염색한 후 분석하였다.

<127> 플라크 형성 분석

<128> 릴렉신 발현에 따른 플라크의 크기 변화를 관찰하기 위해 6-웰 플레이트에 3×10^5 개의 Hep3B 세포주를 분주하고 다음날 Ad- Δ E1B 또는 Ad- Δ E1B-RLX 아데노바이러스를 3 PFU의 역가로 처리하였다. 바이러스 감염 후 4시간경에 37℃의 2X DMEM(10% 우태아 혈청과 항생제 페닐실린/스트렙토마이신 포함)과 42℃의 1.4% 아가로스가 1:1로 혼합된 아가로스-DMEM을 감염된 세포주 위에 첨가한 뒤, 37℃, 5% CO₂ 항온 배양기에서 배양하였다. 배양후 약 10 일경에 플레이트에 형성된 플라크의 크기를 확인하고 아가로스 오버레이 위에 10% TCA (trichoroacetic acid)를 1 ml 넣고 30분 동안 방치한 후 아가로스 오버레이를 제거하고 0.5% 크리스탈 바이올렛 (in 50% 메탄올)으로 고정 시키고 염색하였다.

<129> 유세포 분석에 의한 세포고사 관찰

<130> 릴렉신에 의해 유도되는 세포고사를 확인하기 위하여 여러 종류의 인체 종양 세포주들인 U343, U87MG, C33A, Hep3B 그리고 A549를 25T 배양기에 분주한 후 24시

출원번호: 10-2004-0021601

간경에 Ad- Δ E1B 또는 Ad- Δ E1B-RLX 아데노바이러스를 0.5-5 MOI로 각각 감염시켰다. 양성 대조군으로는 0.1-1 μ M CPT-11 (camptothecin)와 음성 대조군으로는 PBS를 처리하여 48시간, 72시간, 그리고 96시간에 감염된 세포들을 회수하여 70% 에탄올로 4℃에서 24 시간 이상 고정시켰다. 고정이 끝난 후 PI (propidium iodide, 50 μ g/ μ l)와 RNase가 혼합된 용액을 넣고 15분간 반응시킨 뒤 유세포 분석을 시행하였다. 또한, 릴렉신에 의해 유도되는 초기 세포고사를 검증하기 위해, 상기와 같은 방법으로 여러 종류의 인체 종양 세포주들을 Ad- Δ E1B 또는 Ad- Δ E1B-RLX 아데노바이러스로 각각 감염시켰다. 바이러스 감염 후 세포들을 회수하여 ApoAlert V-FITC 세포고사 키트 (CLONTECH, Palo Alto, CA)를 이용하여 제조회사가 제시한 방법에 따라 Annexin V/PI 이중염색하여 유세포 분석을 시행하였다.

<131> 튜널 분석

<132> 여러 종류의 인체 종양 세포주 U343(5×10^4), U87MG(5×10^4), C33A(5×10^5), Hep3B(4×10^5) 및 A549(5×10^4)를 각각 챔버 슬라이드에 분주하고, 아데노바이러스를 0.2-20 MOI로 감염시킨 후 24시간과 48시간경에 배지를 제거하고, ApoTag 키트 (intergen, Purchase, NY)을 이용해 제조회사가 제시한 방법에 따라 튜널 (TUNEL) 분석을 시행하였다. 발색 여부를 확인하기 위해 퍼옥시다아제와 결합된 아비딘을 사용하여 디아미노벤진 (DAKO, Carpinteria, CA)과 반응시킨 후 세포들이 갈색으로 변하는 것이 육안으로 확인되면 0.5% 메틸 그린으로 10분간 염색하고 현미경으로

출원번호: 10-2004-0021601

관찰하였다. 현미경 상에서 네 곳 이상의 부위를 무작위로 정하여 전체 세포들 중 염색된 세포의 비율을 계산하였다.

<133> 릴렉신을 발현하는 복제 가능 아데노바이러스의 생체내 함종양 효과 검증

<134> 누드 생쥐에 형성된 인체 암종괴의 성장에 Ad- Δ E1B-RLX이 미치는 영향을 검증하기 위해, 생후 6-8주된 누드 생쥐의 복벽에 피하로 1×10^7 개의 여러 종류의 인체 종양 세포주 (U343, U87MG, C33A, Hep3B 및 A549)를 각각 주사한 뒤, 종양이 약 50-80 mm³ 정도 성장하였을 때 5×10^7 - 5×10^8 PFU의 Ad- Δ E1B 또는 Ad- Δ E1B-RLX 아데노바이러스를 음성 대조군인 PBS와 함께 각각 이틀 간격으로 3번 종양에 직접 주사한 후 종양의 성장을 관찰하였다. 종양의 용적은 캘리퍼를 이용하여 종양의 장축과 단축을 측정한 후 다음과 같은 공식으로 산출하였다: 종양의 용적= (단축 mm)² x 장축mm x 0.523

<135> 릴렉신을 발현하는 복제 가능 아데노바이러스 투여에 따른 종양의 변화 관찰

<136> 누드 생쥐의 복벽에 형성된 C33A 종양이 약 50-80 mm³ 정도로 성장하였을 때, 5×10^7 PFU의 Ad- Δ E1B-RLX 또는 Ad- Δ E1B 아데노바이러스를 음성 대조군인 PBS와 함께 3회 종양내 주사한 후 3일 뒤에 종양 조직을 적출하여 파라핀 블록을 제작하였다. 제작된 파라핀 블록을 4 μ m 두께의 슬라이드로 절단한 뒤, 이를 자

출원번호: 10-2004-0021601

일렌 100%, 95%, 80%, 70% 에탄올 용액에 차례로 담귀 파라핀을 제거한 후 헤마토자일린과 에오신으로 염색하였다. 생체내 결체조직의 구성 성분인 콜라겐의 분포를 관찰하기 위하여는, 4 μ m 두께의 파라핀 블록 슬라이드를 보울린 (bouin), 헤마토자일린과 비에브리츠 스칼릿 산 푸크신 (biebrich's scarlet acid fuchsin)로 염색하여 관찰하였다.

<137> 또한 동일한 부위의 파라핀 블록을 이용하여, 아데노바이러스의 헥손 (hexon) 부위를 검출할 수 있는 면역조직화학염색을 시행하였다. 상기와 같은 방법으로 슬라이드를 탈파라핀화한 후, 아데노바이러스의 헥손 부위와 선택적으로 결합하는 항체(AB1056F; chemicon, Temecula, CA)를 일차 항체로, 그리고 염소 anti-라트 IgG-HRP (Sata Cruz Biotechnology, Inc., Sata Cruz, CA)를 이차 항체로 반응시키고 DAB(DAKO, Carpinteria, CA)를 첨가하여 발색시켜 관찰하였다.

<138> 종양내 세포고사 여부도 동일한 부위의 파라핀 블록 슬라이드를 이용하여 관찰하였다. ApoTag 키트 (intergen, Purchase, NY)을 이용해 제조회사가 제시한 방법에 따라 튜널 분석을 시행하였으며, 퍼옥시다아제와 결합된 아비딘을 사용하여 디아미노벤진 (DAKO, Carpinteria, CA)과 반응시킨 후 세포들이 갈색으로 변하는 것이 육안으로 확인되면 0.5% 메틸 그린으로 10 분간 염색하고 현미경으로 관찰하였다.

<139> 자이모그래피 (Zymograpy)를 이용한 MMP 발현 양상 규명

출원번호: 10-2004-0021601

<140>

MMP (Metalloproteinase) 활성 변화를 관찰하기 위하여, U343 세포주를 75T 배양기에 분주하고 24시간 뒤에 PBS, Ad- Δ E1B, 또는 Ad- Δ E1B-RLX 아데노바이러스를 첨가하고 48시간 동안 배양하였다. 이후 우태아 혈청이 포함되지 않은 DMEM 배지로 교체하고 24시간 동안 배양한 뒤 배지를 회수하여 농축하였으며, 농축된 배지 20 μ l를 젤라틴-기질 겔에 전기영동하였다. 전기영동 후, 겔을 37°C에서 18시간 동안 젤라틴분해반응이 일어나도록 한 뒤 쿠마쉬 블루로 염색하여 MMP2와 MMP9의 발현을 관찰하였다.

<141> 실험 결과

<142> 릴렉신을 발현하는 아데노바이러스의 제작과 릴렉신 발현양상 규명

<143> 릴렉신 유전자의 발현에 따른 조직내 침투력의 변화를 가시적으로 관찰하기 위하여, 표지 유전자로 LacZ 유전자를 발현하는 dl-LacZ-RLX 복제 불능 아데노바이러스를 제작하였으며, 또한 복제 가능 아데노바이러스의 조직내 침투력을 향상시키고자 Ad- Δ E1B-RLX 종양 특이적 살상 아데노바이러스를 제작하였다 (도 1). 제작된 아데노바이러스들에 의해 발현되는 릴렉신의 발현양상을 검증하기 위하여, 자궁암 세포주인 C33A에 dl-LacZ, dl-LacZ-RLX, Ad- Δ E1B, 또는 Ad- Δ E1B-RLX 아데노바이러스를 여러 역가로 각각 감염시키고 세포로부터 배지를 회수해서 ELISA를 시행하였다 (도 2). 복제 불능 아데노바이러스의 음성 대조군인 dl-LacZ와 종양 특이적 살상 아데노바이러스의 음성 대조군인 Ad- Δ E1B 아데노바이러스로 감염된 세포에서

출원번호: 10-2004-0021601

는 락신의 발현을 관찰할 수 없는 반면, dl-LacZ-RLX 또는 Ad-ΔE1B-RLX 아데노 바이러스로 감염된 세포에서는 투여된 아데노바이러스의 역가가 증가함에 따라 락신의 발현량이 용량 의존적으로 증가하는 것을 관찰할 수 있었다.

<144> 종양구를 이용한 dl-LacZ-RLX 아데노바이러스의 생체의 암조직 침투성 검증

<145> dl-LacZ-RLX의 종양구내에 유전자 전달 효율과 조직 침투성을 알아보기 위해, 여러 종류의 인체 종양 세포주들을 nude 생쥐에 피하 주사한 후 종양의 크기가 약 150-200 mm³ 되었을 때 종양을 적출하였다. 적출된 종양 조직은 1-2 mm 정도의 직경으로 잘게 잘라서 배양액에 넣은 후, 1×10^6 , 1×10^7 , 또는 1×10^8 PFU의 아데노바이러스를 각각 배지에 첨가하고 48시간 후에 X-gal 염색을 시행하였다.

종양구를 광학 현미경으로 관찰한 결과, 1×10^6 PFU의 dl-LacZ 아데노바이러스를 투여한 경우에 비해 동 역가의 dl-LacZ-RLX 아데노바이러스를 투여한 종양구의 표면에 X-gal이 진하게 염색된 것을 관찰할 수 있었으며, 1×10^7 또는 1×10^8 PFU의 아데노바이러스를 배지에 첨가한 경우에는 모든 종양구의 표면 전체가 X-gal로 진하게 염색되어있음을 관찰하였다. 아데노바이러스의 종양구내로의 침투 정도를 보다 면밀히 관찰하기 위해, X-gal 염색된 종양구를 동결 박편하여 관찰하였다.

그 결과 1×10^6 , 1×10^7 또는 1×10^8 PFU의 dl-LacZ가 투여된 암조직의 경우 LacZ 발현 정도가 미약하고 바이러스가 종양구 표면에 머물러 있는 반면, 동 역가의 dl-

출원번호: 10-2004-0021601

LacZ-RLX가 투여된 암조직에서의 LacZ 발현도가 dl-LacZ의 경우보다 현저히 높았으며, 아데노바이러스가 종양구 표면에 국한되지 않고 종양구 안쪽 부위로 바이러스가 퍼져나감을 확인할 수 있었다 (도 3). 이러한 실험결과들을 통해 림팩신을 발현하는 dl-LacZ-RLX 아데노바이러스의 유전자 전달효율이 종양구 내에서 대조군 dl-LacZ에 비해 크게 증가되었음을 알 수 있었다.

<146> dl-LacZ-RLX 아데노바이러스의 생체내 암조직 침투성 검증

<147> 생체의 종양구를 이용한 실험 결과를 통해 확인한 dl-LacZ-RLX 아데노바이러스의 증가된 조직 침투력을 제노그래프트 (xenograft) 모델을 이용하여 검증해 보았다. 누드 생쥐의 복벽에 형성된 종양에 dl-LacZ 또는 dl-LacZ-RLX 아데노바이러스를 5×10^7 또는 1×10^8 PFU의 역가로 종양내에 직접 주사한 후 3일경에 종양을 적출하여 동결 박편한 뒤 X-gal 염색을 시행하였다. 그 결과, dl-LacZ를 투여한 조직의 경우에는 LacZ의 발현 정도가 미약하고 염색부위가 바이러스가 투여된 조직부근에 한정되어 있는 반면, dl-LacZ-RLX을 투여한 조직의 LacZ 발현도는 dl-LacZ를 투여한 조직에 비해 현저히 높고 X-gal로 염색된 부위가 바이러스가 투여된 곳에 국한되지 않고 넓은 부위로 퍼져있음을 확인할 수 있었다 (도 4). 특히, U87MG 또는 C33A의 경우에는 종양 조직 전체에서 LacZ가 발현되어 짙은 푸른색으로 염색된 것을 확인할 수 있었다. 이러한 실험 결과들을 통해, 생체 내에서도 종양구를 이용한 실험과 마찬가지로 dl-LacZ-RLX 아데노바이러스의 조직 침투성이 림팩신

출원번호: 10-2004-0021601

을 발현하지 않는 대조군 아데노바이러스인 dl-LacZ에 비해 크게 증가하였음을 알 수 있었다.

<148> 릴렉신을 발현하는 종양 특이적 살상 아데노바이러스의 세포 살상능 검증

<149> 선행된 실험들로 이미 확인된 릴렉신의 발현에 따른 아데노바이러스의 조직 내 확산의 증가로 인해 종양 특이적 살상 아데노바이러스의 세포 살상능이 증가되는지를 알아보기 위해 CPE 분석을 시행하였다. 음성 대조군으로 복제 불능 아데노바이러스인 dl-LacZ와 종양 특이적 살상 아데노바이러스인 Ad- Δ E1B 또는 Ad- Δ E1B-RLX를 0.1-10 MOI 역가로 여러 인체 종양 세포주들 (U343, U87MG, C33A, Hep3B 및 A549)을 각각 감염시킨 뒤 세포 살상 정도를 비교 관찰하였다. 도 5에서 볼 수 있듯이, 음성 대조군인 dl-LacZ로 감염된 여러 암세포들에서는 바이러스의 증식에 의한 세포 살상효과가 관찰되지 않았으나, Ad- Δ E1B-RLX으로 감염된 경우에는 릴렉신이 발현되지 않는 대조군 바이러스인 Ad- Δ E1B에 비해 약 2-10배정도 높은 암세포 살상효과가 관찰되었다. 즉, Hep3B 세포주에서는 Ad- Δ E1B-RLX 아데노바이러스가 Ad- Δ E1B 아데노바이러스에 비해 약 10배정도 높은 암세포 살상 효과를 나타내었으며, U87MG, C33A 그리고 A549 에서는 약 5배정도 높은 암세포 살상효과를 나타내었다. 이러한 실험결과들에 따라 릴렉신의 발현이 아데노바이러스의 복제능에 부정적인 영향을 미치지 않을 뿐만 아니라, 오히려 릴렉신의 발현으로 암세포 특이적 살상 아데노바이러스의 세포 살상능이 증가되는 것을 알 수 있었다.

<150> 틸렉신 발현에 따른 플라크 형성 비교

<151> 틸렉신의 발현이 세포살상과 주변세포로의 바이러스 확산에 미치는 영향을 가시화하기 위해, 아가로스가 함유된 고체 배지에서 아데노바이러스의 증식과 주변 세포로의 확산에 따른 플라크의 형성을 비교 검증하였다. Ad- Δ E1B 또는 Ad- Δ E1B-RLX 아데노바이러스를 각각 3 MOI의 역가로 Hep3B 세포주에 감염시키고 플라크 형성 진행속도를 관찰하였다. 도 6a 및 6b에서 볼 수 있듯이, Ad- Δ E1B에 감염된 경우에 비해 Ad- Δ E1B-RLX으로 감염된 Hep3B 세포주에서 플라크의 형성이 빠르게 진행되고, 형성된 플라크의 크기도 증가한 것을 관찰할 수 있었다. 즉, Ad- Δ E1B 아데노바이러스를 투여한 경우에는 바이러스 감염 후 16 일이 지나서야 플라크의 형성을 육안으로 확인할 수 있는 것에 비해, Ad- Δ E1B-RLX를 감염시킨 경우에는 바이러스 감염 후 4 일경부터 형성된 플라크를 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 틸렉신을 발현하는 아데노바이러스의 증가된 세포 살상능과 인접한 세포로의 바이러스 확산으로 플라크의 형성이 빠르게 진행되고 또한 형성된 플라크의 크기가 증가하였음을 의미한다.

<152> 틸렉신을 발현하는 아데노바이러스에 의한 세포고사 유도

<153> 틸렉신의 발현양상을 알아보기 위해 복제 불능 아데노바이러스인 dl-LacZ-RLX으로 세포를 감염시킨 경우, 세포들이 사멸되어 세포 배양 플레이트 바닥으로부터 떨어져 나가는 것이 관찰되었기 때문에 틸렉신에 의해서 세포살상이 일어나는지

출원번호: 10-2004-0021601

를 알아보았다. 먼저, 릴렉신에 의해 세포고사가 유도되는지를 검증하기 위하여, 세포고사가 일어나면 DNA가 무작위적으로 절편화되어 나타나는 subG₁ 세포군의 증가율을 PI 염색후 유세포 분석을 시행하여 측정하였다. 여러 종류의 인체 종양 세포주들을 Ad-ΔE1B-RLX 또는 Ad-ΔE1B 아데노바이러스로 각각 감염시키고 48-96시간 뒤에 세포를 회수하여 subG₁ 세포군의 증가를 관찰하였다 (도 7). 세포고사를 유도하는 양성 대조군으로서는 세포고사 유도 화학물질인 CPT-11을 사용하였다. Ad-ΔE1B에 의해 감염된 A549 세포들에서 subG₁ 세포군이 약 3.11%인 것에 비하여 릴렉신을 발현하는 아데노바이러스인 Ad-ΔE1B-RLX에 의해 감염된 경우에는 subG₁ 세포군이 약 22.90%로 크게 증가하였다. 이러한 Ad-ΔE1B-RLX 아데노바이러스 감염에 의한 subG₁ 세포군의 증가는 다른 여러 종류의 세포주들 (U343, U87MG, C33A 및 Hep3B)에서도 관찰되었다.

<154>

또한, 릴렉신 유전자가 세포살상에 미치는 영향을 좀더 면밀히 관찰하기 위하여, Ad-ΔE1B-RLX 아데노바이러스에 의한 세포고사 진행정도를 Annexin-V와 PI로 이중염색하여 확인하였다. Annexin-V는 세포고사 초기에 세포막 밖으로 유출되어 나온 포스타티딜세린 (phosphatidylserine: PS)를 검출할 수 있는 반면에, PI는 세포고사 후기에 세포막의 파괴로 세포내로 들어가 핵내에 있는 크로마틴과 결합할 수 있어 세포괴사 (necrosis)의 특징을 확인할 수 있다. 따라서 Annexin-V⁻/PI⁻는 건강한 세포를 의미하며, Annexin-V⁺/PI⁻는 세포고사가 일어난 세포, 그리고 PI⁺ 세

출원번호: 10-2004-0021601

포는 세포괴사가 일어난 세포를 의미한다.

<155> 세포고사를 유도하는 양성 대조군으로 이용된 CPT-11을 처리한 C33A 세포주
의 경우 약 57.10% ($\text{Annexin-V}^+/\text{PI}^-$)의 세포들이 세포고사로 진행되었으며, Ad- Δ
E1B 또는 Ad- Δ E1B-RLX에 의해 감염된 경우는 각각 21.99%와 33.03%의 세포에서 세
포고사가 유도되어 Ad- Δ E1B-RLX 아데노바이러스에 의한 세포고사 빈도가 Ad- Δ E1B
아데노바이러스에 비해 증가하였음을 관찰하였다 (도 8). 이외에도 U343, U87MG,
Hep3B 그리고 A549 세포주들에서도 대조군 Ad- Δ E1B 아데노바이러스에 비해 릴렉신
을 발현하는 아데노바이러스에 의해 훨씬 높은 빈도로 세포고사가 유도되는 것을
확인할 수 있었다. 또한, 세포사를 총괄적으로 측정할 수 있는 세포고사 및 세포
고사 빈도를 모두 합한 경우 ($\text{Annexin-V}^+/\text{PI}^- + \text{PI}^+$)에도, Ad- Δ E1B-RLX 아데노바이
러스에 의해 유도되어지는 세포사 빈도가 Ad- Δ E1B 아데노바이러스에 비해 월등히
증가하였다.

<156> 이상과 같은 결과들을 종합하여 볼 때, Ad- Δ E1B-RLX 아데노바이러스에 감염
된 경우에 대조군 Ad- Δ E1B 아데노바이러스에 의해 감염되었을 때 보다 세포고사가
현저히 높은 빈도로 진행되어 결과적으로 세포사가 증가하는 것을 알 수 있다.

<157> 초기 세포내 고사의 특징인 DNA 절편화를 확인할 수 있는 또 다른 분석방법
인 튜널 분석을 시행하였다. 도 9에서 볼 수 있듯이, 양성 대조군으로 사용된
CPT-11을 처리한 모든 세포주의 경우에는 거의 대부분의 세포들이 진한 갈색으로

출원번호: 10-2004-0021601

염색되어 세포고사가 활발히 진행되고 있음을 확인하였다. U343 세포주를 Ad- Δ E1B 아데노바이러스로 감염시킨 경우, 약 $32.5 \pm 12.5\%$ 의 세포들이 갈색으로 호리게 염색된 반면, Ad- Δ E1B-RLX 아데노바이러스로 감염시킨 경우는 약 $69.7 \pm 5.40\%$ 의 세포들이 진한 갈색으로 염색되어 Ad- Δ E1B 아데노바이러스가 훨씬 높은 빈도도로 세포고사를 유도하였다(표 1). 이와 같은 릴렉신 발현에 따른 세포고사 빈도의 증가 현상은 다른 세포주들에서도 비슷한 경향으로 관찰되었다.

【표 1】

<158>

종양세포주	세포고사 세포 비율 (%)			
	PBS	CPT	Ad- Δ E1B	Ad- Δ E1B-RLX
U343	10.5 ± 5.83	53.5 ± 7.45	32.51 ± 2.5	69.7 ± 5.40
U87MG	$2.51 \pm .11$	83.0 ± 29.29	16.5 ± 5.21	77.0 ± 17.98
C33A	5.65 ± 3.29	60.1 ± 25.91	45.2 ± 7.61	79.8 ± 20.51
Hep3B	1.65 ± 0.61	71.2 ± 15.73	38.5 ± 2.65	69.7 ± 15.64
A549	3.5 ± 0.83	37.5 ± 5.35	34.8 ± 11.3	75.21 ± 1.22

<159> 릴렉신을 발현하는 종양 특이적 살상 아데노바이러스의 생체내 항종양 효과 검증

<160>

릴렉신을 발현하는 Ad- Δ E1B-RLX 아데노바이러스의 생체내 항종양 효과를 검증하기 위해, 여러 종류의 인체 종양 세포주를 누드 생쥐에 접종한 후 형성된 종양에 5×10^7 - 5×10^8 PFU 의 Ad- Δ E1B-RLX 또는 Ad- Δ E1B 아데노바이러스를 음성 대조군인 PBS와 함께 이틀 간격으로 3번 종양내 투여 한 후 종양의 성장을 관찰하였다. 인체 뇌종양 U87MG의 경우, PBS를 투여 받았을 때는 바이러스 투여 후 19 일에 종양의 크기가 약 $1089 \pm 167.22 \text{ mm}^3$ 로 종양이 급격히 성장한 반면, 종양 특이적

출원번호: 10-2004-0021601

살상 아데노바이러스인 Ad- Δ E1B 또는 Ad- Δ E1B-RLX을 투여 받았을 때는 각각 $115.70 \pm 19.60 \text{ mm}^3$ 과 $55.63 \pm 28.42 \text{ mm}^3$ 으로 종양의 성장이 현격하게 지연됨을 관찰 할 수 있었다 (도 10).

<161> 즉, Ad- Δ E1B 또는 Ad- Δ E1B-RLX 아데노바이러스를 투여 받은 종양에서 PBS를 투여받은 경우에 비해 약 10-30배 정도의 뚜렷한 항종양 효과가 나타났다. 또한 바이러스 투여 25 일 뒤에는 PBS를 투여한 9 마리의 쥐들이 모두 죽어 더 이상 종양의 성장을 측정할 수 없었고, 바이러스 투여 후 33 일 후에는 Ad- Δ E1B 또는 Ad- Δ E1B-RLX 아데노바이러스를 투여한 경우에는 종양의 크기가 각각 $399.68 \pm 96.95 \text{ mm}^3$ 와 $64.51 \pm 36.73 \text{ mm}^3$ 로 림팩신을 발현하는 아데노바이러스에 의한 항종양 효과가 대조군인 Ad- Δ E1B 아데노바이러스에 비해 우수함을 확인하였다. 또한, Ad- Δ E1B-RLX 아데노바이러스를 투여한 경우, 바이러스 투여 후 19 일경에 7 마리의 생쥐들 중 2 마리에서 그리고 41 일경에는 5 마리에서 종양이 완전히 사라짐을 관찰 할 수 있었고, 60 일이 지나도 종양의 재성장은 관찰되지 않았다.

<162> 이러한 Ad- Δ E1B-RLX의 탁월한 항종양 효과가 다른 인체 종양모델에서도 적용될 수 있는지를 알아보기 위해, C33A, A549, Hep3B, 그리고 U343 제노그래프트에서 상기의 방법과 동일한 방법으로 항종양 효과를 검증하였다. 도 10에서 볼 수 있듯이, 음성 대조군인 PBS를 투여한 군에 비하여 종양 특이적 살상 아데노바이러스인 Ad- Δ E1B-RLX 또는 Ad- Δ E1B을 투여한 군에서 뚜렷한 항종양 효과가 관찰되었으며, 림팩신을 발현하는 아데노바이러스를 투여받은 경우에 종양의 크기가 대조군

출원번호: 10-2004-0021601

바이러스인 Ad- Δ E1B을 투여받은 경우에 비해 현저히 감소하여 릴렉신에 의한 뚜렷한 항종양 효과를 관찰할 수 있었다.

<163> 릴렉신을 발현하는 복제 가능 아데노바이러스 투여에 따른 종양의 변화 관찰

<164> 인체 자궁암 세포주 C33A를 누드 생쥐 복벽 피하에 접종한 후 형성된 종양에 Ad- Δ E1B-RLX 또는 Ad- Δ E1B 아데노바이러스를 음성 대조군인 PBS와 함께 3회 종양 내 주사한 후 3일 뒤에 종양 조직을 적출하여 헤마토자일린과 에오신으로 염색하여 조직의 상태를 검증하였다 (도 11). Ad- Δ E1B를 투여한 종양의 경우는 종괴의 가운데 부위에서 세포괴사가 진행되어 세포들이 죽어있는 반면, Ad- Δ E1B-RLX를 투여한 종양의 경우에는 바이러스를 투여한 종양의 가장자리에서 세포괴사가 진행됨을 확인하였다.

<165> 또한, 종양 조직내에서의 암세포 특이적 살상 아데노바이러스의 복제 양상을 검증하기 위하여, 아데노바이러스의 핵소 부위와 선택적으로 결합하는 항체를 이용하여 면역조직화학염색을 시행하였다. 도 11에서 볼 수 있듯이, Ad- Δ E1B-RLX를 투여한 종양의 경우에 세포괴사가 진행되고 있는 종양의 가장자리에서 아데노바이러스를 검출할 수 있었으며, 세포괴사를 확인할 수 있는 튜널 분석을 시행한 경우에도 같은 부위에서 세포괴사가 활발히 진행됨을 확인할 수 있었다. 이와는 대조적으로, Ad- Δ E1B를 투여한 종양의 경우에는 종양 조직의 중심부위에서 세포괴사 또는 세포괴사가 진행되고 있었다.

출원번호: 10-2004-0021601

<166> 이상의 결과들을 종합해 볼 때, Ad- Δ E1B-RLX 아데노바이러스가 투여된 부위에서 바이러스의 복제가 활발히 일어나고, 그 결과 세포고사 및 세포괴사가 유도된다는 것을 알 수 있었다.

<167> 마손스 트리크롬 (Masson's trichrome) 염색을 이용한 종양내 콜라겐 분포 검증

<168> 인체 뇌암 세포주 U343을 누드 생쥐에 접종한 후 형성된 종양에 Ad- Δ E1B-RLX 또는 Ad- Δ E1B 아데노바이러스를 음성 대조군인 PBS와 함께 3번 종양내 주사한 후 3일 뒤에 종양 조직을 적출하여 마손스 트리크롬으로 염색하여 푸른색으로 염색되는 세포외기질의 주성분인 콜라겐의 분포를 관찰하였다. 그 결과, PBS 또는 Ad- Δ E1B 아데노바이러스를 투여한 경우에는 종양 내부에서 푸른색 염색들이 종양 세포들 사이에서 현저하게 많이 관찰된 반면, Ad- Δ E1B-RLX 아데노바이러스를 투여한 경우에는 종양 내부에서는 거의 푸른색을 관찰할 수 없었으며 종양 주위를 둘러싸고 있는 정상조직에서만 콜라겐 캡슐 같은 형태를 관찰할 수 있었다.

<169> 자이모그래피를 이용한 MMP 발현 양상 규명

<170> 릴렉신 발현에 의한 세포외기질의 감소가 MMP 발현에 의해서 유도되는 것인지를 확인하기 위하여, MMP-2 와 MMP-9의 활성을 자이모그래피를 통하여 검증하였다. 인체 종양 세포주 U343을 여러 역가의 아데노바이러스로 감염시키고 배지를 회수하여 MMP2 와 MMP9의 발현을 관찰한 결과, PBS군에 비해 Ad- Δ E1B 또는 Ad- Δ

출원번호: 10-2004-0021601

E1B-RLX 아데노바이러스에 감염된 세포주의 경우에 MMP-9의 활성이 증가되었음을 확인하였다 (도 13 및 표 2). 특히, Ad- Δ E1B 아데노바이러스로 감염된 경우보다 Ad- Δ E1B-RLX 아데노바이러스로 감염된 세포의 경우에 MMP-9의 활성이 크게 증가하였으며, MOI 5 역가의 바이러스를 투여한 경우에는 아무 것도 처리하지 않은 대조군 세포주 (c)에 비해서 약 10.06 배정도로 크게 증가하였다. MMP-2의 경우에도 Ad- Δ E1B 아데노바이러스를 투여한 경우보다 Ad- Δ E1B-RLX 아데노바이러스를 투여한 경우에 활성이 증가하여 MOI 5 역가의 바이러스를 투여한 경우에 대조군 세포주에 비해서 약 1.8 배정도 증가하였다. 이러한 결과들에 의해서 릴랙신 발현에 의해 MMP-2 와 MMP-9의 활성이 증가되었음을 알 수 있었다.

【표 2】

<171> 도 13의 밴드 세기 분석

MMP 종류	Ad- Δ E1B (MOI)				Ad- Δ E1B-RLX (MOI)		
	0	1	3	5	1	3	5
MMP-9	1.00	2.33	1.68	1.69	3.61	7.79	10.06
MMP-2	1.00	1.54	1.07	1.18	1.68	1.75	1.80

【발명의 효과】

<172> 이상에서 상세히 설명하였듯이, 본 발명은 릴랙신 (relaxin)-인코딩 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 신규한 유전자 전달 시스템, 재조합 아데노바이러스, 상기 유전자 전달 시스템을 이용한 유전자 전달 방법, 상기 재조합 아데노바이러스를 포함하는 약제학적 항종양 조성물, 개선된 조직 침투성을 갖는 약제학적 조성물 및

출원번호: 10-2004-0021601

세포외기질의 과도한 축적-관여 질병 또는 질환의 치료용 억제학적 조성물을 제공한다. 본 발명에 따르면, 릴렉신이 유전자 전달 효율을 개선시킬 뿐만 아니라, 종양세포에서 세포고사를 증가시켜 우수한 종양세포 살상능을 나타낸다.

<173>

이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

【특허청구범위】

【청구항 1】

세포내로 운반하고자 하는 목적 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 유전자 전달 시스템에 있어서, 상기 유전자 전달 시스템은 릴랙신 (relaxin)-인코딩 뉴클레오타이드 서열을 추가적으로 포함하며 상기 릴랙신은 상기 목적 뉴클레오타이드 서열의 세포내 운반 효율을 증가시키는 작용을 하는 것을 특징으로 하는 유전자 전달 시스템.

【청구항 2】

제 1 항에 있어서, 상기 세포는 세포외기질로 연결된 세포들로 이루어진 조직내의 세포인 것을 특징으로 하는 유전자 전달 시스템.

【청구항 3】

제 2 항에 있어서, 상기 조직은 종양 조직인 것을 특징으로 하는 유전자 전달 시스템.

【청구항 4】

제 1 항에 있어서, 상기 유전자 전달 시스템은 플라스미드, 재조합 아데노바이러스, 아데노-관련 바이러스 (Adeno-associated viruses: AAV), 레트로바이러스,

출원번호: 10-2004-0021601

렌티바이러스, 헤르페스 심플렉스 바이러스, 배시니아 바이러스, 리포좀 또는 니오솜인 것을 특징으로 하는 유전자 전달 시스템.

【청구항 5】

제 4 항에 있어서, 상기 유전자 전달 시스템은 재조합 아데노바이러스인 것을 특징으로 하는 유전자 전달 시스템.

【청구항 6】

제 5 항에 있어서, 상기 재조합 아데노바이러스는 E3 영역이 결실된 것이고, 상기 릴랙신 (relaxin)-인코딩 뉴클레오타이드 서열은 E3 영역 위치에 삽입된 것을 특징으로 하는 유전자 전달 시스템.

【청구항 7】

상기 제 1 항 내지 제 6 항의 유전자 전달 시스템을 세포를 포함하는 생시료 (biosample)에 접촉시키는 단계를 포함하는 유전자 전달 방법.

【청구항 8】

아데노바이러스의 ITR (inverted terminal repeat) 뉴클레오타이드 서열 및 릴랙신 (relaxin)-인코딩 뉴클레오타이드 서열을 포함하며, 상기 릴랙신은 아데노

출원번호: 10-2004-0021601

바이러스의 종양조직 침투능 및 종양세포 고사능을 증대시키는 작용을 하는 것을 특징으로 하는 재조합 아데노바이러스.

【청구항 9】

제 8 항에 있어서, 상기 재조합 아데노바이러스는 E3 유전자 영역이 결실된 것이고, 상기 릴랙신 (relaxin)-인코딩 뉴클레오타이드 서열은 상기 E3 유전자 영역의 위치에 삽입된 것을 특징으로 하는 재조합 아데노바이러스.

【청구항 10】

제 8 항에 있어서, 상기 재조합 아데노바이러스는 비활성화된 E1B 19 유전자, E1B 55 유전자 또는 E1B 19/E1B 55 유전자를 갖는 것을 특징으로 하는 재조합 아데노바이러스.

【청구항 11】

제 8 항에 있어서, 상기 재조합 아데노바이러스는 활성의 E1A 유전자를 포함하는 것을 특징으로 하는 재조합 아데노바이러스.

【청구항 12】

(a) 상기 제 8 항 내지 제 11 항 중 어느 한 항의 재조합 아데노바이러스의

출원번호: 10-2004-0021601

치료학적 유효량; 및 (b) 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 항종양 조성물.

【청구항 13】

(a) 약물의 조직 침투성을 개선하기 위한 릴랙신 단백질; 및 (b) 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 개선된 조직 침투성을 갖는 약제학적 조성물.

【청구항 14】

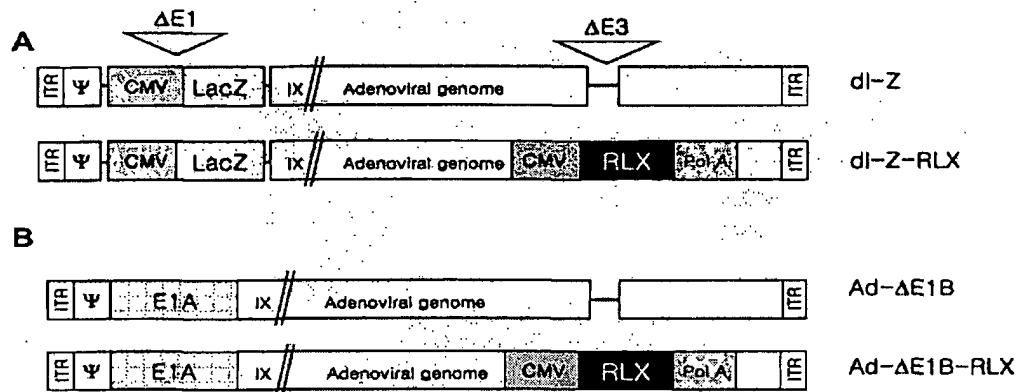
(a) 릴랙신 (relaxin)-인코딩 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 유전자 전달 시스템 또는 릴랙신 단백질의 치료학적 유효량; 및 (b) 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 세포외기질의 과도한 축적-관여 질환 또는 상태의 치료용 약제학적 조성물.

【청구항 15】

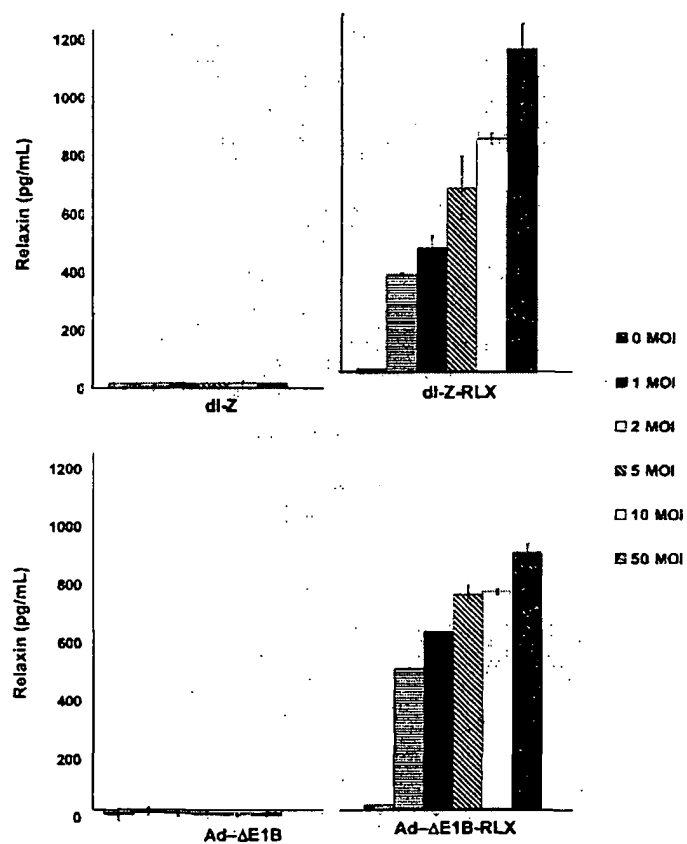
제 14 항에 있어서, 상기 세포외기질의 과도한 축적-관여 질병 또는 질환은 반흔, 간경변, 폐섬유증, 사구체신염, 성인 또는 급성 호흡곤란증, 간섬유증, 신장 섬유증, 후심근경색섬유증, 섬유낭포성 질환, 섬유증암, 정맥폐색증 또는 신장간질 섬유증인 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

【도면】

【도 1】



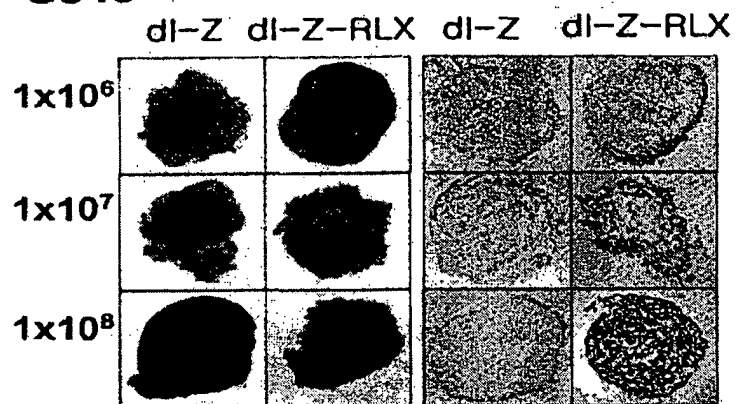
【도 2】



출원번호: 10-2004-0021601

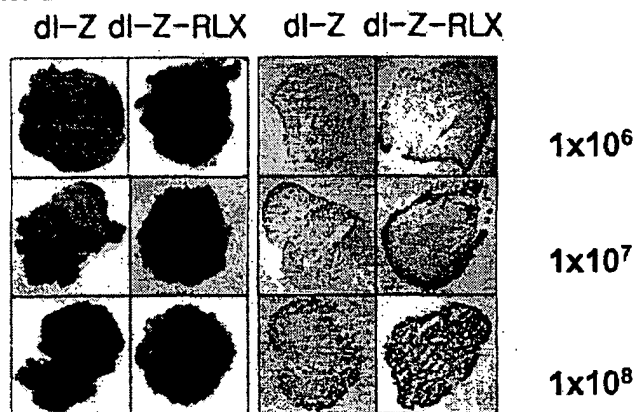
【도 3a】

U343



【도 3b】

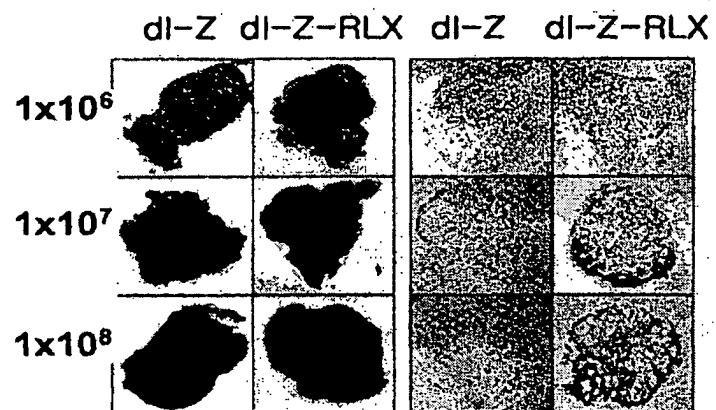
U87MG



출원번호: 10-2004-0021601

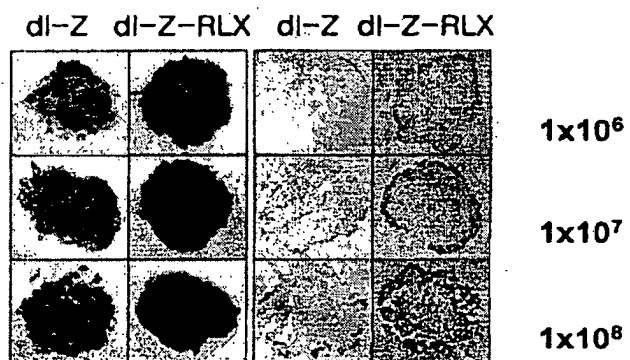
【도 3c】

C33A



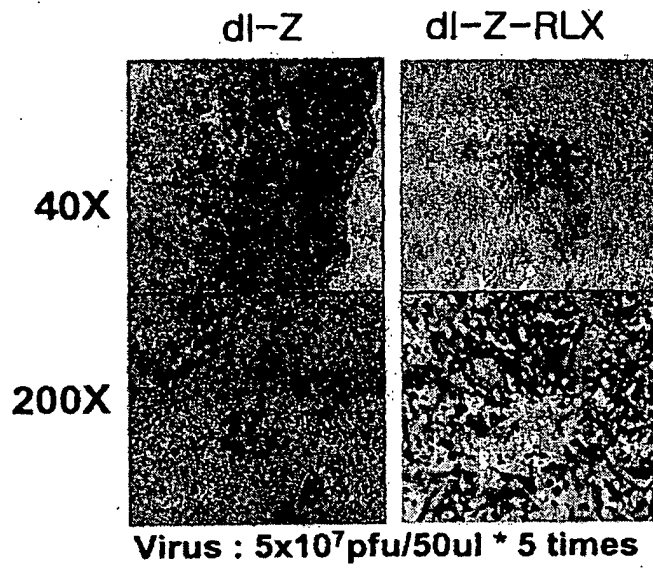
【도 3d】

A549

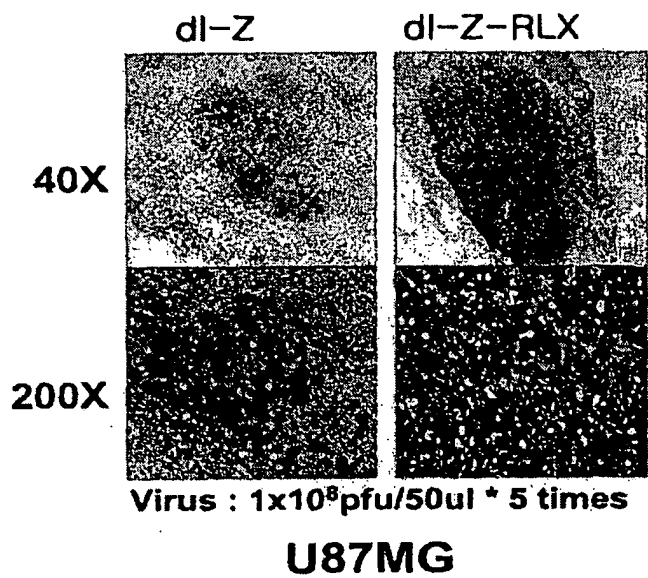


출원번호: 10-2004-0021601

【도 4a】

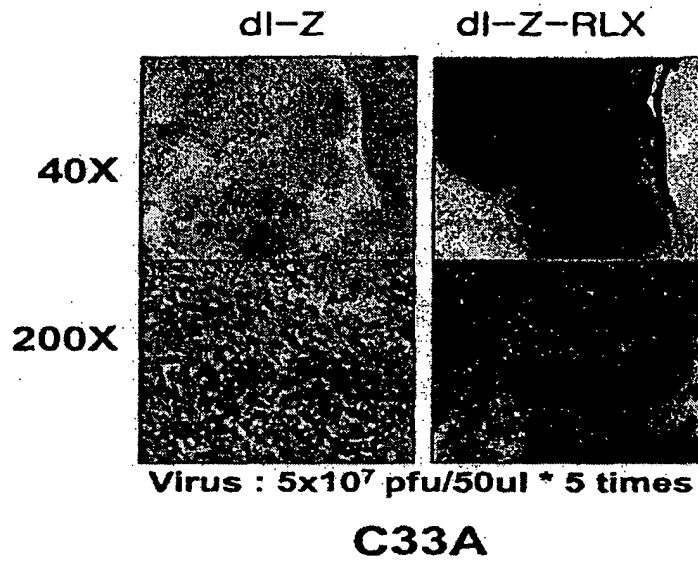


【도 4b】

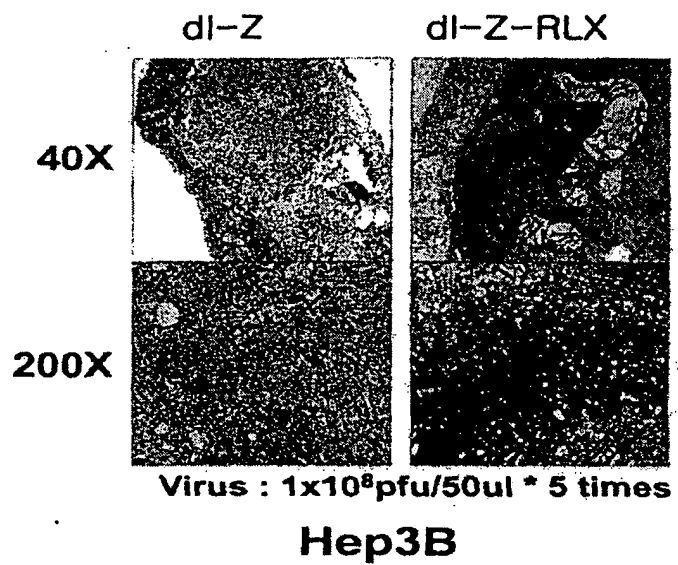


출원번호: 10-2004-0021601

【도 4c】

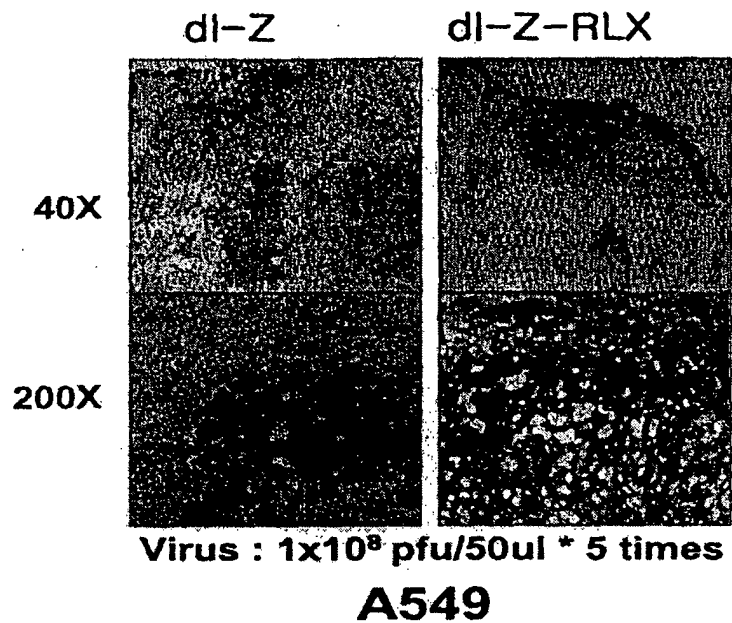


【도 4d】

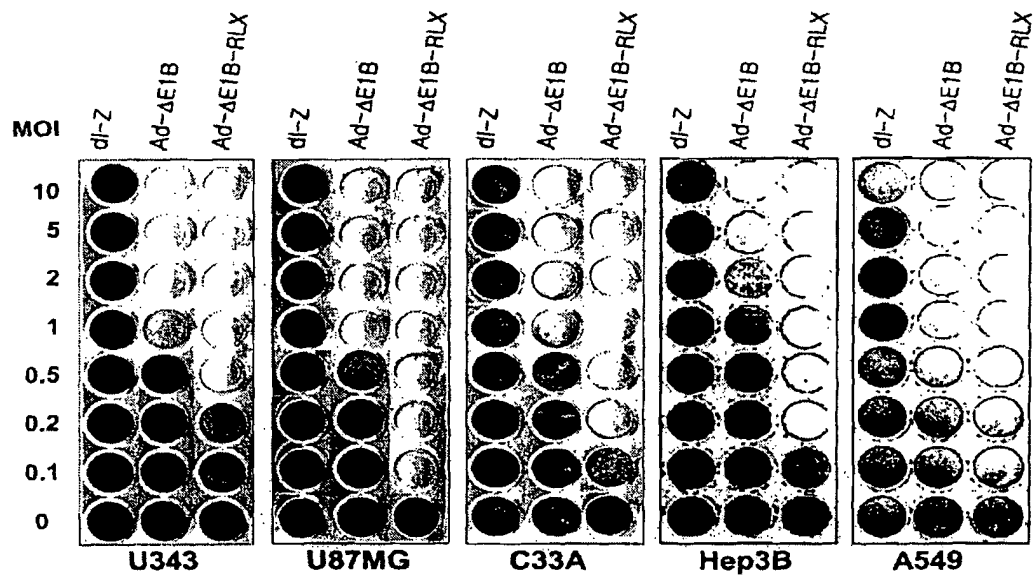


출원번호: 10-2004-0021601

【도 4e】

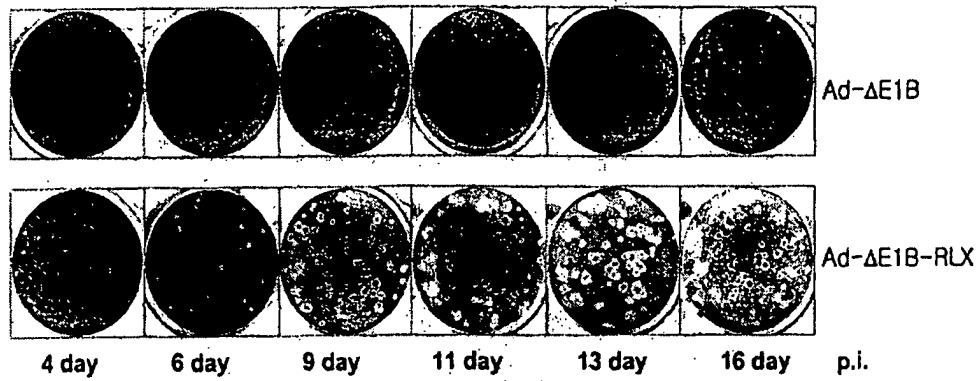


【도 5】

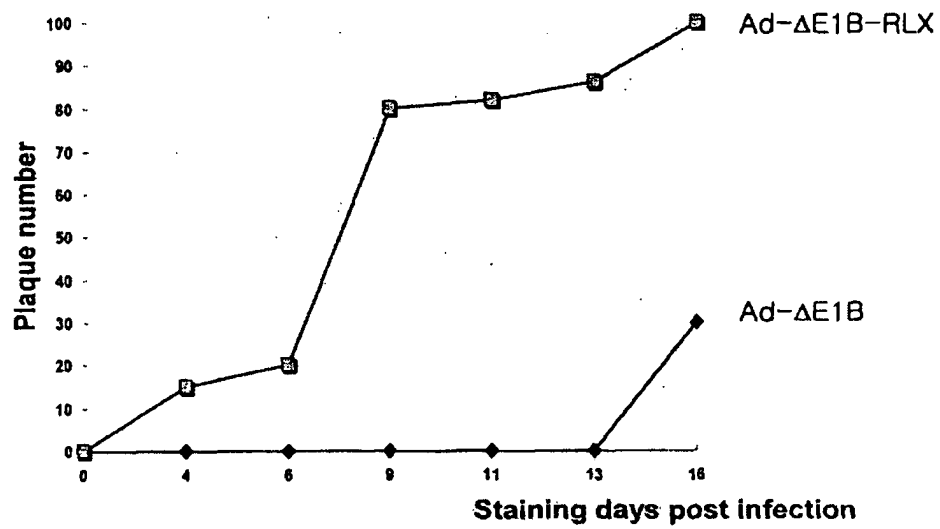


출원번호: 10-2004-0021601

【도 6a】

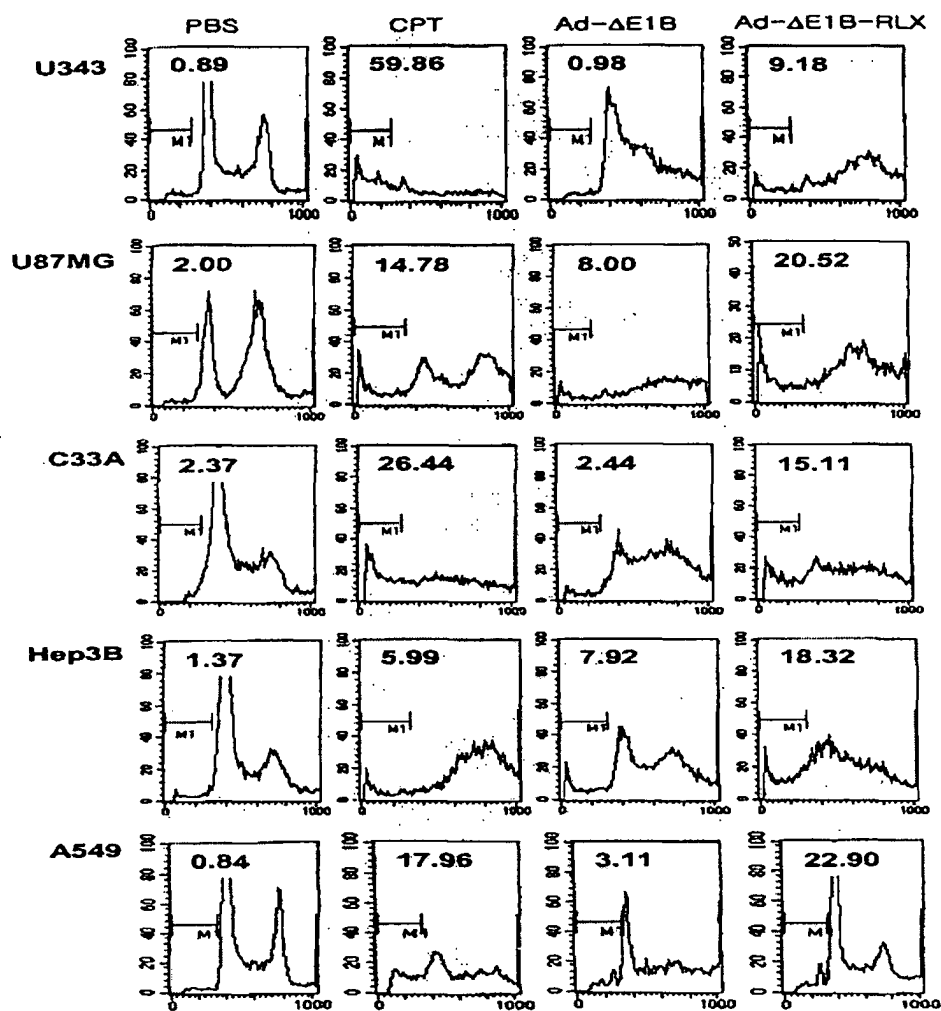


【도 6b】



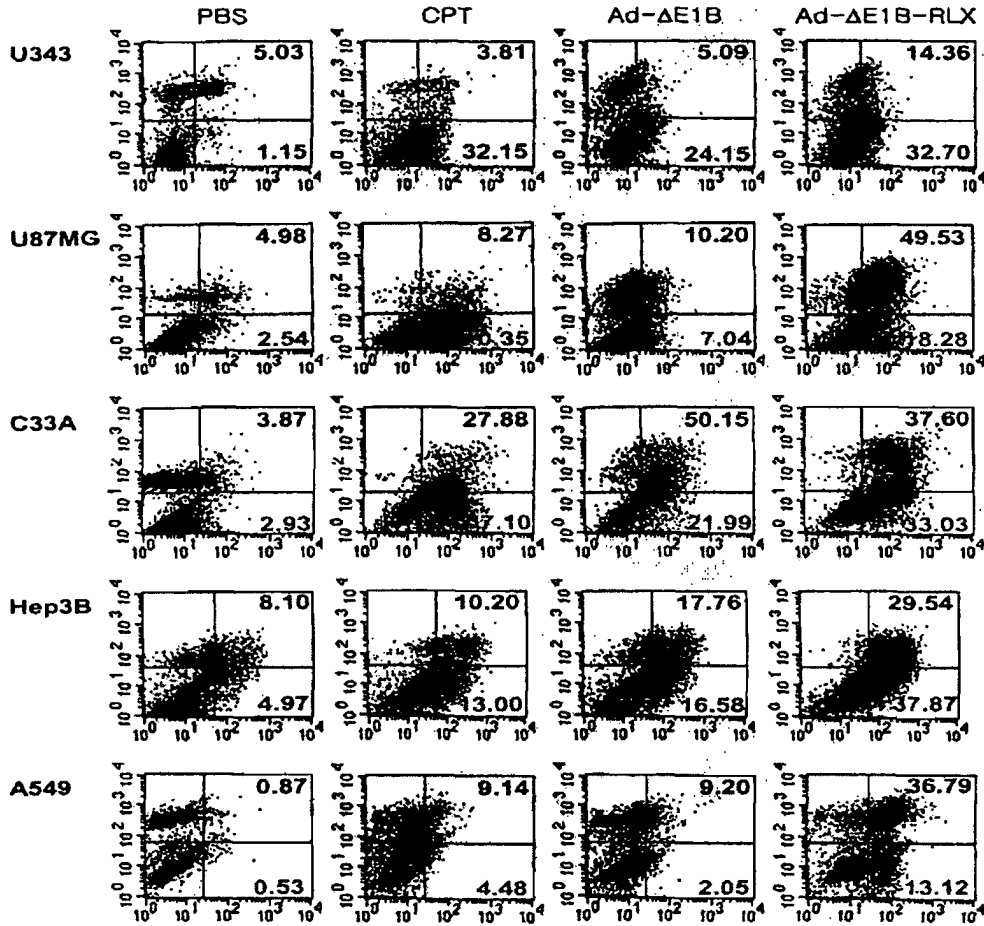
출원번호: 10-2004-0021601

【도 7】

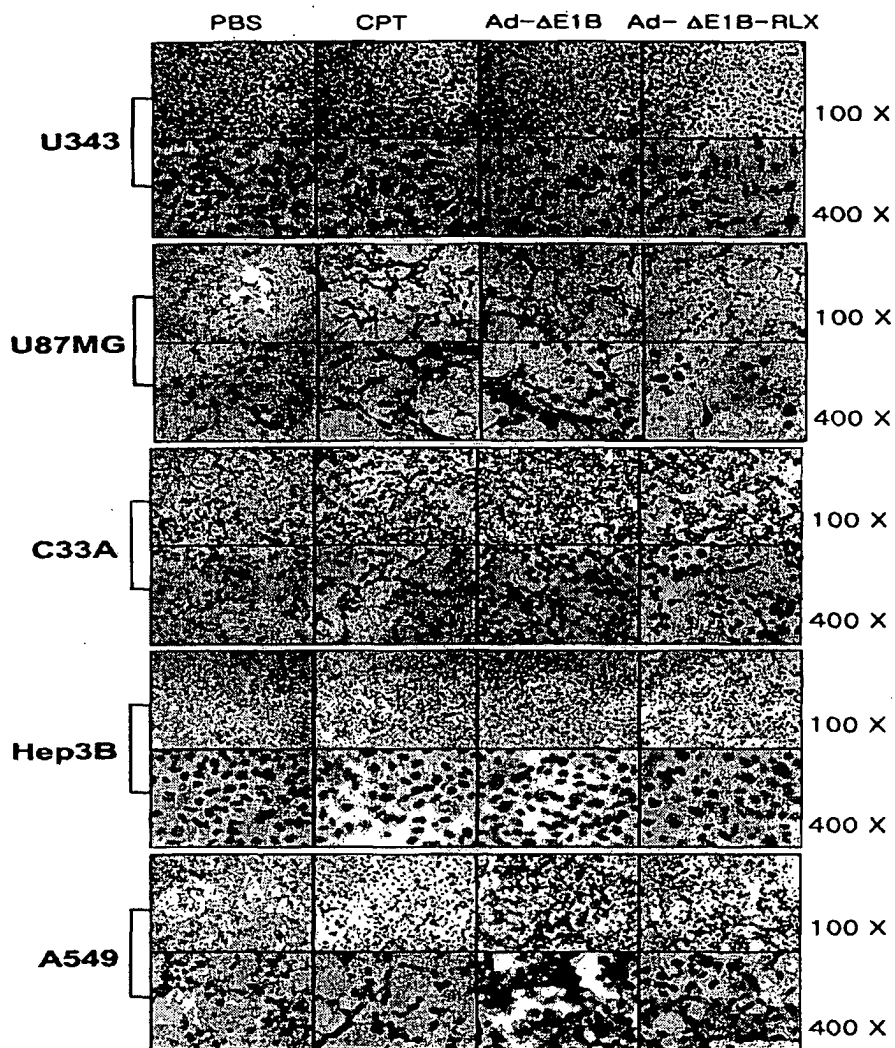


출원번호: 10-2004-0021601

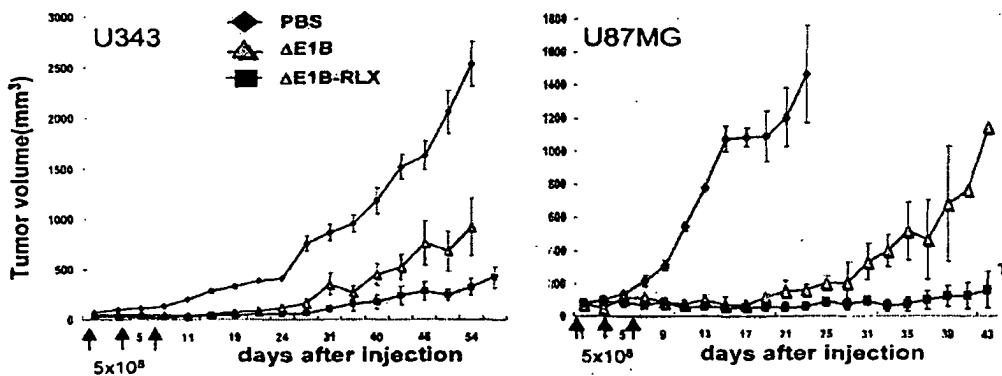
【도 8】



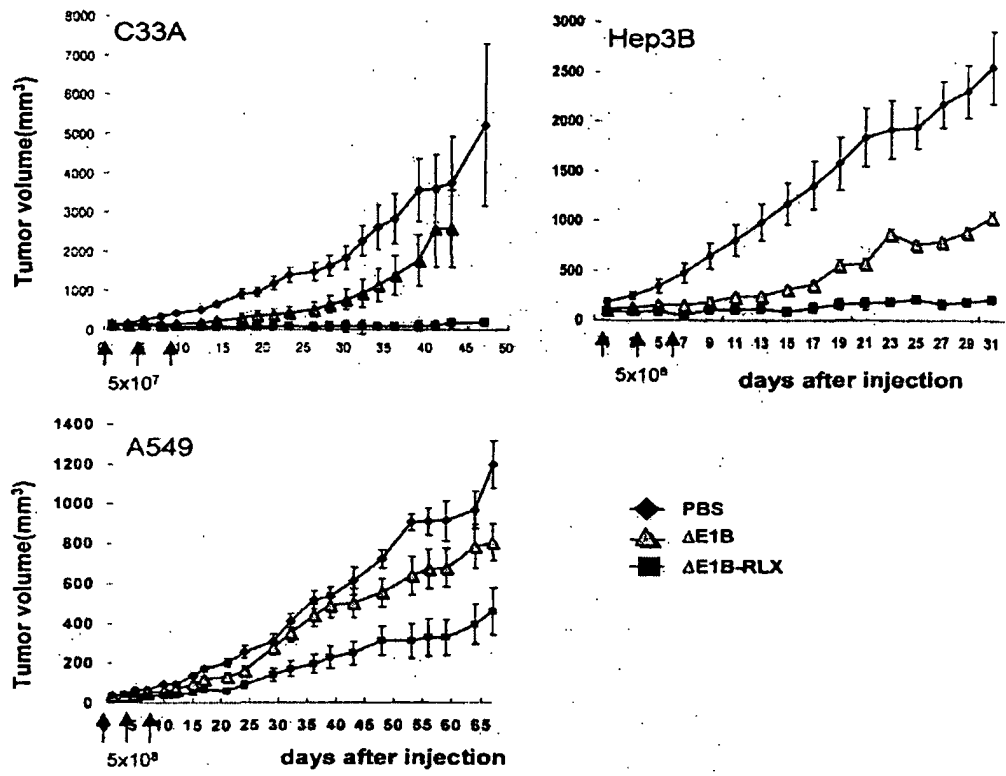
【도 9】



【도 10a】

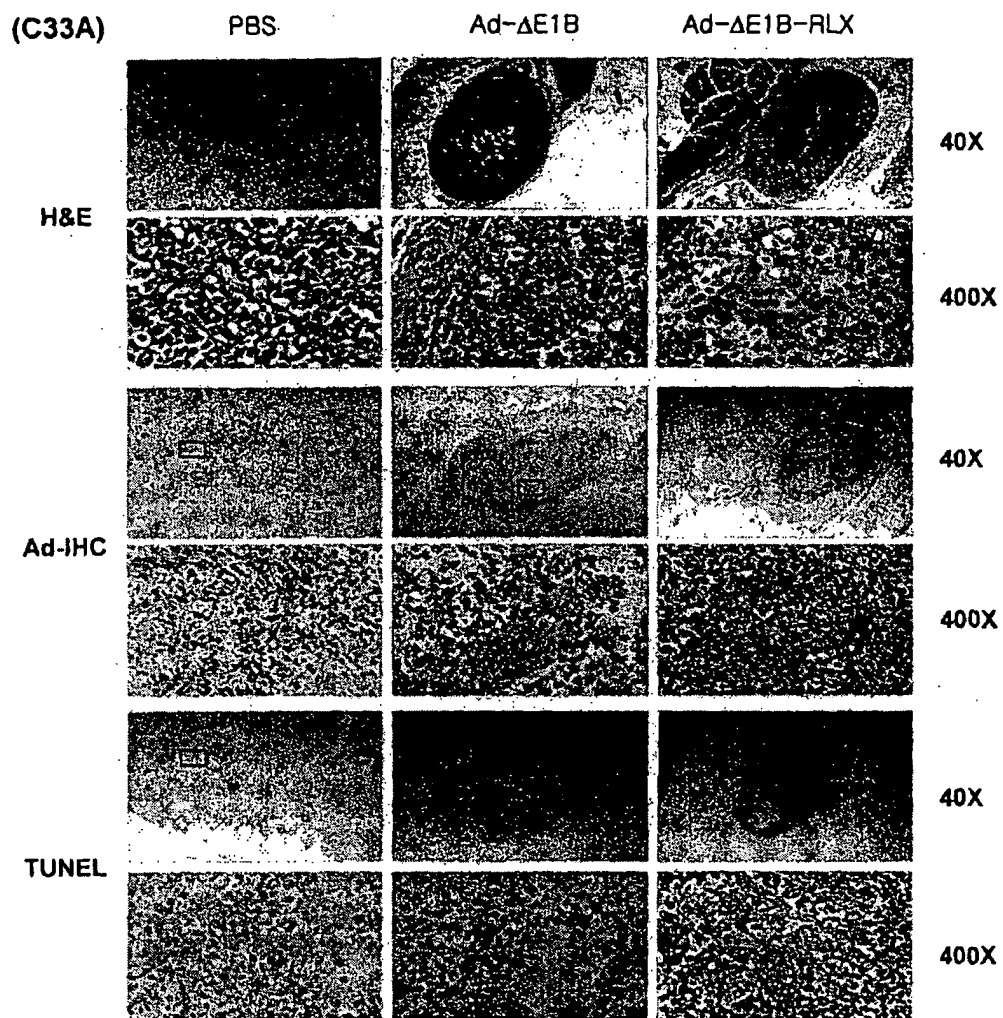


【도 10b】



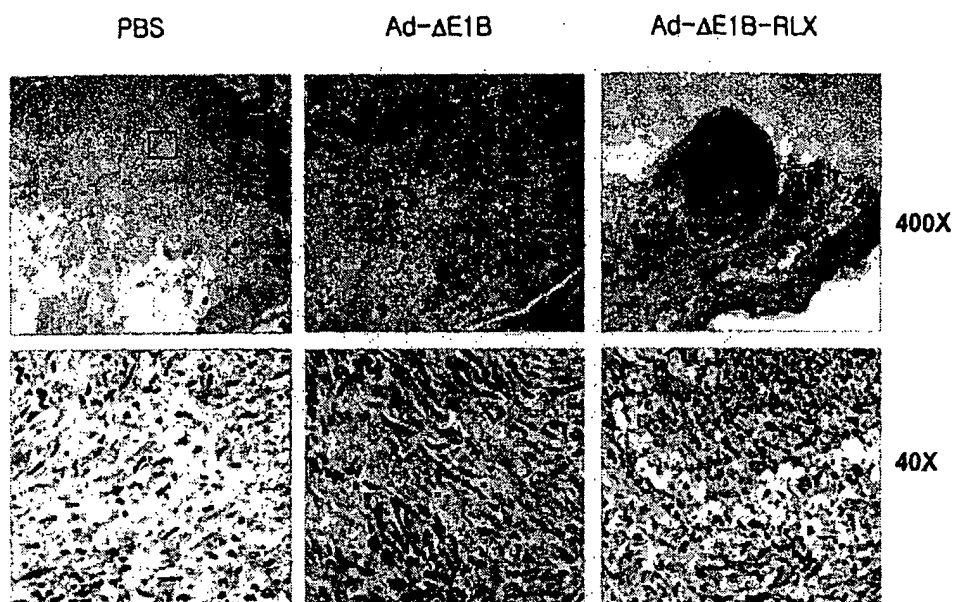
출원번호: 10-2004-0021601

【도 11】

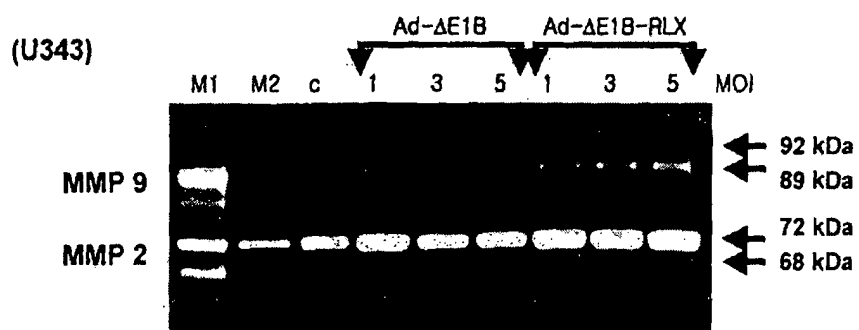


출원 번호: 10-2004-0021601

【도 12】



【도 13】



IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Inventors: Chae-Ok Yun

Serial No.: 10/599,521

Filed: September 29, 2006

Title: Gene Delivery System Containing Relaxin Gene)
and Pharmaceutical Composition Using Relaxin)

STATEMENT OF
ACCURACY

Hon. Commissioner of Patents and Trademarks
Alexandria, Virginia, 22313-1450

Sir:

The undersigned hereby states that the attached English language patent application is an accurate translation of *Korean* patent application filed on March 30, 2004 and assigned Serial No. 10-2004-0021601.

Date: February 3, 2010

Signed: _____



Printed Name: Boo-Hyun YANG

[ABSTRACT]**[ABSTRACT]**

The present invention relates to a novel gene delivery system and recombinant adenovirus comprising the relaxin-
5 encoding sequence to enhance transduction efficiency of transgenes, a pharmaceutical anti-tumor composition comprising the recombinant adenovirus, a pharmaceutical composition having improved tissue penetration potency and a pharmaceutical composition for treating a disease or disorder associated with
10 accumulation of excess extracellular matrix.

[Representative Figure]

Fig. 6b

15 [Key Words]

Relaxin, gene delivery system, adenovirus, tumor, cancer, apoptosis, extracellular matrix, fibrosis

[SPECIFICATION]**[Title of Invention]**

Gene Delivery System Containing Relaxin Gene and
Pharmaceutical Composition Using Relaxin

5

[Brief Description of the Drawings]

Fig. 1 schematically represents a genetic map of the
recombinant adenoviruses used in Examples.

Fig. 2 is a graph showing relaxin expression profiles of the
10 recombinant adenovirus of this invention.

Figs. 3a-3d are photographs representing *in vitro* tissue
penetration of the relaxin-expression adenovirus of this
invention into tumors such as U343, U87MG, C33A and A549.

Figs. 4a-4e are photographs representing *in vivo* tissue
15 penetration of the relaxin-expression adenovirus of this
invention into tumors such as U343, U87MG, C33A, Hep3B and A549.

Fig. 5 represents the results of CPE (cytopathic effect)
analysis demonstrating cell killing potency of the relaxin-
expressing adenovirus of this invention.

20 Figs. 6a-6b represent the results of plaque development
assay of the relaxin-expressing adenovirus of this invention.

Fig. 7 shows the results of flow cytometry analysis for subG₁
cell population verifying the ability of the recombinant
adenovirus of this invention to induce apoptosis.

25 Fig. 8 shows the results of flow cytometry analysis for
Annexin-V and PI dual staining verifying the ability of the
recombinant adenovirus of this invention to induce apoptosis.

Fig. 9 represents the results of TUNEL assay for DNA
fragmentations demonstrating the ability of the recombinant

adenovirus of this invention to induce apoptosis.

Figs. 10a-10b represent *in vivo* anti-tumor effect of the relaxin-expressing adenovirus of this invention

Fig. 11 represents histological changes of tumors in tumor-
5 bearing mice injected with the relaxin-expressing adenovirus of this invention.

Fig. 12 represents collagen distribution within tumors in tumor-bearing mice injected with the relaxin-expressing adenovirus of this invention.

10 Fig. 13 is a gel photograph verifying whether the decrease in extracellular matrix by relaxin expression of the recombinant adenovirus is induced by MMP (matrix metalloprotease) expression.

15 **[Detailed Description of this Invention]**

[Purposes of this Invention]

[Filed of the Invention and Related Art]

The present invention relates to a novel gene delivery system and recombinant adenovirus, in particular, to a novel
20 gene delivery system and recombinant adenovirus comprising the relaxin-encoding sequence, a pharmaceutical anti-tumor composition comprising the recombinant adenovirus, a pharmaceutical composition characterized by improved tissue penetration potency and a pharmaceutical composition for
25 treating a disease or disorder associated with accumulation of excess extracellular matrix.

Gene therapy is directed to the treatment of a pathological condition by introducing an exogenous gene into cells or

tissues. For hereditary diseases such as sickle cell anemia, α_1 antitrypsin deficiency, phenylketonuria, hemophilia and cystic fibrosis, the aim of gene therapy is to replace a missing or defective gene in order to allow a cell or tissue to function normally. In addition, gene therapy is used to remove aberrant cells. Gene therapy permits to treat various diseases such as cancer, inflammation and autoimmune diseases by delivering genes capable of causing the death of target aberrant cells.

In spite of the promise of gene therapy, inefficient delivery of genes to cells or tissues remains a major obstacle in the development of a successful gene therapy. For example, a number of researches on gene delivery using retrovirus, adenovirus or adeno-associated viruses (AAV) have showed insufficient gene delivery efficiency when applied to individual or tissues (e.g., tumor tissues), discouraging the application of gene therapy.

Therefore, a novel gene delivery strategy exhibiting improved gene delivery efficiency remains essential for accomplishing a successful gene therapy.

Early adenovirus-based gene therapy usually employs replication-incompetent adenoviruses carrying a therapeutic gene with deleted E1 gene essential for adenovirus replication. However, these recombinant adenoviruses induce anti-tumor activity only in infected cells and a very small number of surrounding cells, exhibiting serious problems in clinical applications.

To overcome such problems, the oncolytic adenovirus, ONYX-015(d11520) selectively replicating in tumor cells has been developed. The E1B 55 kDa gene-deleted adenovirus selectively

replicates in tumor cells lacking functional p53. When the recombinant adenovirus infects normal cells, its proliferation is inhibited to result in the failure of oncolysis because p53 inactivation is not induced, whereas it actively proliferates in tumor cells with inactivated p53 and eventually leads to selective death of tumor cells (Chang, F., et al., *J Clin Oncol* 13:1009-22(1995)).

According to recent reports on Phase-II/III clinical trials for brain cancer, a tumor-specific oncolytic adenovirus exhibits considerable therapeutic efficacy (Kirn, D., et al., *Nat Med* 4:1341-2(1998); Nemunaitis, J. et al., *Cancer Res* 60:6359-66(2000); and Ganly, I. et al., *Clin Cancer Res* 6:798-806(2000)). Although the administration of the recombinant adenovirus induces the partial suppression of tumor growth, the complete eradication of tumor does not been found and regrowth of tumor rapidly occurs after the lapse of a period of time. These results are probably because the recombinant adenovirus topically injected into tumor are partially spread within a limited surrounding portion to elicit a restricted anti-tumor activity such that tumor cells not infected with viruses rapidly grow. According to a recent research report, the recombinant adenoviruses administered into human tumor in nude mice persistently replicate as late as 100 days after initial viral injection and do not ensure the complete eradication of tumor, while viable viruses may be obtained from tumor tissue (Sauthoff, H. et al., *Human Gene Therapy* 14:425-433(2003)).

Consequently, it could be appreciated that the ideal tumor-specific oncolytic adenovirus has the ability to induce greater oncolytic activity and spread throughout tumor tissue as well

for infecting surrounding tumor cells.

Throughout this application, several patents and publications are referenced and citations are provided in parentheses. The disclosure of these patents and publications is incorporated into this application in order to more fully describe this invention and the state of the art to which this invention pertains.

10 **[Technical Problems Solved by the Invention]**

The present inventors have made intensive researches to improve the transduction efficiency of gene delivery systems, particularly, to enhance the transduction (or spreading) efficiency of gene delivery systems in tissues, as a result, discovering that relaxin could dramatically improve the transduction efficiency of gene delivery systems.

Accordingly, it is an object of this invention to provide a gene delivery system with improved transduction efficiency.

It is another object of this invention to provide a method for delivering a gene into cells with improved transduction efficiency.

It is still another object of this invention to provide a recombinant adenovirus having improved abilities in tumor tissue penetration and tumor-specific apoptosis.

25 It is further object of this invention to provide a pharmaceutical anti-tumor composition for treating a cancer.

It is still further object of this invention to provide a method for treating a cancer by use of the pharmaceutical anti-tumor composition.

It is another object of this invention to provide a pharmaceutical composition for improving a penetration potency of a medicament into a tissue.

It is still another object of this invention to provide a
5 pharmaceutical composition for treating a disease or condition associated with accumulation of excess extracellular matrix.

Other objects and advantages of the present invention will become apparent from the detailed description to follow taken
10 in conjugation with the appended claims and drawings.

[Construction of the Invention]

In one aspect of this invention, there is provided a gene delivery system comprising a nucleotide sequence of interest to
15 be delivered into a cell, the improvement which comprises a relaxin-encoding nucleotide sequence to enhance a transduction efficiency of the nucleotide sequence of interest into the cell.

The present inventors have made intensive researches to
20 improve the transduction efficiency of gene delivery systems, particularly, to enhance the transduction (or spreading) efficiency of gene delivery systems in tissues. Such researches are based on our hypothesis that the reduction in the level of components of extracellular matrix by facilitating the
25 degradation or inhibiting the synthesis of components of extracellular matrix may enhance the spreading of gene delivery systems within tissues. Surprisingly, the present inventors have discovered that relaxin could dramatically improve the transduction efficiency of gene delivery systems.

The term "relaxin" used herein encompasses relaxin illustrated and exemplified in Examples as well as its any homologue to enhance transduction efficiency that is intent of the present invention.

5 Relaxin, that plays a pivotal role as an enhancer in improving transduction efficiency in the present invention, is a 6 kDa peptide hormone, structurally related to insulin and insulin-like growth factors (IGFs). It is predominantly produced in corpus luteum and endometrium and its serum level
10 greatly increases during pregnancy (Sherwood, O.D. et al., Dynamic changes of multiple forms of serum immunoactive relaxin during pregnancy in the rat. *Endocrinology* 114:806-13(1984)). While relaxin was initially classified as "pregnancy hormone" based on earlier studies to report that it was active only in
15 sex organs during pregnancy, it was recently known as "master hormone" because its activity was found in other organs and tissues than sex organs (Hisaw, F. L., et al., Effects of relaxin on the endothelium of endometrial blood vessels in monkeys (*Macaca mulatta*). *Endocrinology* 81:375-85(1967)).

20 Relaxin is known to facilitate the growth and regeneration of placenta and uterus and loosen of uterine cervix to broaden birth canal during parturition. It promotes the expression of various MMPs in birth canal tissues such as MMP2, MMP3 and MMP9 to degrade collagen, so that connective tissues and basal
25 membranes are degraded to lead to the disruption of extracellular matrix of birth canal. In addition to this, the promotion of MMP 1 and MMP 3 expressions by relaxin is also observed in lung, heart, skin, intestines, mammary gland, blood vessel and spermiduct where relaxin plays a role as an

inhibitor to prevent overexpression of collagen (Qin, X., et al., *Biol Reprod* 56:800-11(1997); Qin, X., et al., *Biol Reprod* 56:812-20(1997); and Palejwala, S. et al., *Endocrinology* 142:3405-13(2001)).

5 According to the gene delivery system of the present invention, the relaxin protein expressed induces the degradation of collagen, a major component of extracellular matrix surrounding cells, to disrupt connective tissue and basal membrane, thereby resulting in the degradation of
10 extracellular matrix. This successive action is one of mechanisms underlying the improvement in transduction efficiency by relaxin, which is clearly verified in Examples described below.

Therefore, referring to the above-described action of
15 relaxin, the advantages of the present gene delivery system is highlighted for cells within tissues composed of cells interconnected each other by extracellular matrix. In particular, where applied to tumor tissues enclosed tightly by connective tissue, the present gene delivery system exhibits improved
20 transduction efficiency compared to any conventional delivery system.

To construct the present gene delivery system, it is preferred that the relaxin-encoding nucleotide sequence is contained in a suitable expression construct. According the
25 expression construct, it is preferred that the relaxin-encoding nucleotide sequence is operatively linked to a promoter. The term "operatively linked" refers to functional linkage between a nucleic acid expression control sequence (such as a promoter, signal sequence, or array of transcription factor binding

sites) and a second nucleic acid sequence, wherein the expression control sequence affects transcription and/or translation of the nucleic acid corresponding to the second sequence. According to the present invention, the promoter
5 linked to the relaxin gene is operable in, preferably, animal, more preferably, mammalian cells, to control transcription of the relaxin gene, including the promoters derived from the genome of mammalian cells or from mammalian viruses, for example, CMV (cytomegalovirus) promoter, the adenovirus late
10 promoter, the vaccinia virus 7.5K promoter, SV40 promoter, HSV tk promoter, RSV promoter, EF1 alpha promoter, metallothionein promoter, beta-actin promoter, human IL-2 gene promoter, human IFN gene promoter, human IL-4 gene promoter, human lymphotoxin gene promoter and human GM-CSF gene promoter. Most preferably,
15 the promoter is CMV promoter.

Preferably, the expression construct used in this invention comprises a polyadenylation sequence (e.g., bovine growth hormone terminator and SV40-derived polyadenylation sequence).

According to a preferred embodiment, the expression
20 construct for the relaxin-encoding nucleotide sequence has a structure of "promoter-relaxin-encoding nucleotide sequence-polyadenylation sequence.

In the present gene delivery system, the nucleotide sequence of interest to be delivered into cells may be contained in an
25 expression construct having the same structure for that for the relaxin-encoding nucleotide sequence.

The nucleotide sequence of interest to be delivered into cells may be any sequence, for example, including cancer-therapeutic genes encoding proteins having anti-tumor activity

and eventually degenerating tumor cells such as tumor suppressor genes, immunomodulatory genes [e.g, cytokine genes, chemokine genes and costimulatory factor genes (for T cell activity such as B7.1 and B7.2)], antigenic genes, suicide
5 genes, cytotoxic genes, cytostatic genes, pro-apoptotic genes and anti-angiogenic genes, but not limited to.

The suicide genes encode proteins capable of conferring to tumor cells sensitivity to chemotherapeutic agents, or of inducing toxic conditions in tumor cells. The most well-known
10 suicide gene is the herpes simplex virus-thymidine kinase (HSV-TK) gene (U.S. Pat. Nos. 5,631,236 and 5,601,818). Cells expressing HSV-TK are susceptible to selective cell death by gancyclovir. The tumor suppressor genes encode polypeptides to inhibit tumorigenesis. The tumor suppressor genes are inherent
15 in mammalian cells and their deletion or inactivation is believed to be a prerequisite for tumorigenesis. Examples of the tumor suppressor genes include members of the tumor suppressor gene INK4 family, which are exemplified by APC, DPC4, NF-1, NF-2, MTS1, WT1, BRCA1, BRCA2, VHL, p53, Rb, MMAC-1,
20 MMSC-2, retinoblastoma gene (Lee et al., *Nature*, 329:642(1987)), gene of adenomatous polyposis coli protein (Albertsen et al., U.S. Pat. No. 5783,666), nasopharyngeal carcinoma tumor suppressor gene that maps at chromosome 3p21.3 (Cheng et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95:3042-3047(1998)), deleted in colon
25 carcinoma (OCC) gene, MTS1, CDK4, VHL, p100Rb, p16 and p21, and and therapeutically effective fragments thereof (e.g., p56Rb, p94Rb). It will be understood that other known anti-tumor genes can be used by those of ordinary skill in the art.

The term "antigenic genes" as used herein, refers to a

nucleotide sequence coding for antigenic cell surface protein which is recognized by the immune system. Examples of the antigenic genes include carcinoembryonic antigen (CEA), prostate specific antigen (PSA), α -feto protein (AFP) and p53 (WO 94/02167). In order to facilitate immune recognition, the antigenic gene may be fused to the MHC type I antigen.

The term "cytotoxic gene" as used herein, refers to a nucleotide sequence, the expression of which in a cell elicits a toxic effect. Examples of the cytotoxic genes include nucleotide sequences encoding *Pseudomonas* exotoxin, ricin toxin, diphtheria toxin and the like.

The term "cytostatic gene" as used herein, refers to a nucleotide sequence, the expression of which in a cell induces an arrest in the cell cycle. Examples of the cytostatic genes include, but are not limited to, p21, retinoblastoma gene, E2F-Rb fusion protein gene, genes encoding cyclin-dependent kinase inhibitors such as p16, p15, p18 and p19, growth arrest specific homeobox (GAX) gene (WO 97/16459 and WO 96/30385).

In addition, a variety of therapeutic genes useful in treating various diseases may be carried in the gene delivery system of this invention. Non-limiting examples of the therapeutic genes include genes encoding cytokines (e.g., interferon- α , interferon- β , interferon- δ and interferon- γ), interleukin (e.g., IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, IL-19 and IL-20), colony-stimulating factors (e.g., GM-CSF and G-CSF), chemokine genes [monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1), monocyte chemotactic protein 2 (MCP-2), monocyte chemotactic protein 3 (MCP-3), monocyte chemotactic protein 4 (MCP-4), macrophage inflammatory protein 1 α (MIP-1 α), macrophage

inflammatory protein 1β (MIP- 1β), macrophage inflammatory protein 1γ (MIP- 1γ), macrophage inflammatory protein 3a (MIP-3a), macrophage inflammatory protein 3β (MIP- 3β), chemokine (ELC), macrophage inflammatory protein 4 (MIP-4), macrophage inflammatory protein 5 (MIP-5), LD78 β , RANTES, SIS-epsilon (p500), thymus and activation-regulated chemokine (TARC), eotaxin, I-309, human protein HCC-1/NCC-2, human protein HCC-3, and mouse protein C10]. In addition, the therapeutic genes include genes encoding tissue-type plasminogen activator (tPA) or urokinase-type plasminogen activator, and LAL-generating gene to provide sustained thrombolysis for preventing hypercholesterolemia. Further, nucleotide sequences available for treatment of various diseases including cystic fibrosis, adenosine deaminase deficiency, AIDS and other infectious diseases, and malignant and inflammatory diseases are known to be useful as therapeutic genes.

The term "pro-apoptotic gene" as used herein, refers to a nucleotide sequence, the expression of which results in the programmed cell death. Examples of the pro-apoptotic genes include p53, adenovirus E3-11.6K (derived from Ad2 and Ad5) or adenovirus E3-10.5K (derived from Ad), adenovirus E4 gene, Fas ligand, TNF- α , TRAIL, p53 pathway genes and genes encoding a series of caspases.

The term "anti-angiogenic gene" as used herein, refers to a nucleotide sequence, the expression of which results in the extracellular secretion of anti-angiogenic factors. Anti-angiogenesis factors include angiostatin, inhibitors of vascular endothelial growth factor (VEGF) such as Tie 2 (PNAS, 1998, 95, 8795-8800), and endostatin.

The nucleotide sequences of interest described previously are available from DNA sequence databases such as GenBank and EMBL.

5 The gene delivery system of the present invention is constructed in a variety of forms, preferably, (i) naked recombinant DNA molecule, (ii) plasmid, (iii) viral vector, or (iv) liposome or neosome containing naked recombinant DNA molecule and plasmid.

10 The relaxin-encoding nucleotide sequence may be applied to a multitude of gene delivery systems useful in gene therapy, preferably, plasmid, adenovirus (Lockett LJ, et al., *Clin. Cancer Res.* 3:2075-2080(1997)), adeno-associated virus (AAV, Lashford LS., et al., *Gene Therapy Technologies, Applications and Regulations* Ed. A. Meager, 1999), retrovirus (Gunzburg WH, et al., *Retroviral vectors. Gene Therapy Technologies, Applications and Regulations* Ed. A. Meager, 1999), lentivirus (Wang G. et al., *J. Clin. Invest.* 104(11):R55-62(1999)), herpes simplex virus (Chamber R., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 92:1411-1415(1995)), vaccinia virus (Puhlmann M. et al., *Human Gene Therapy* 10:649-657(1999)), liposome (Methods in Molecular Biology, Vol 199, S.C. Basu and M. Basu (Eds.), Human Press 2002) or neosome. Most preferably, the gene delivery system of this invention is constructed by incorporating the relaxin-encoding nucleotide sequence to adenoviruses.

25

i. Adenovirus

Adenovirus has been usually employed as a gene delivery system because of its mid-sized genome, ease of manipulation, high titer, wide target-cell range, and high infectivity. Both

ends of the viral genome contains 100-200 bp ITRs (inverted terminal repeats), which are cis elements necessary for viral DNA replication and packaging. The E1 region (E1A and E1B) encodes proteins responsible for the regulation of transcription of the viral genome and a few cellular genes. The expression of the E2 region (E2A and E2B) results in the synthesis of the proteins for viral DNA replication.

Of adenoviral vectors developed so far, the replication incompetent adenovirus having the deleted E1 region is usually used. The deleted E3 region in adenoviral vectors may provide an insertion site for transgenes (Thimmappaya, B. et al., *Cell*, 31:543-551(1982); and Riordan, J. R. et al., *Science*, 245:1066-1073(1989)). Therefore, it is preferred that the relaxin-encoding nucleotide sequence is inserted into either the deleted E1 region (E1A region and/or E1B region, preferably, E1B region) or the deleted E3 region, more preferably, the deleted E3 region. The nucleotide sequence of interest to be delivered is preferably inserted into either the deleted E1 region (E1A region and/or E1B region, preferably, E1B region) or the deleted E3 region, more preferably, the deleted E1 region. Furthermore, the inserted sequences may be incorporated into the deleted E4 region. The term "deletion" with reference to viral genome encompasses whole deletion and partial deletion as well.

According to the most preferred embodiment, the adenoviral gene delivery system of this invention comprises both "promoter-nucleotide sequence of interest-poly A sequence" and "promoter-relaxin gene-poly A sequence". The promoter-nucleotide sequence of interest-poly A sequence is preferably

present in either the deleted E1 region (E1A region and/or E1B region, preferably, E1B region) or the deleted E3 region, more preferably, the deleted E1 region. The promoter-relaxin gene-poly A sequence is preferably present in either the deleted E1
5 region (E1A region and/or E1B region, preferably, E1B region) or the deleted E3 region, more preferably, the deleted E3 region. In addition, the adenoviral gene delivery system may comprise a bicistronic expression system in which the nucleotide sequence of interest and relaxin-encoding nucleotide
10 sequence are linked each other by IRES (internal ribosome entry site) to form "promoter-nucleotide sequence of interest-poly A sequence-relaxin gene-poly A sequence.

In nature, adenovirus can package approximately 105% of the wild-type genome, providing capacity for about 2 extra kb of
15 DNA (Ghosh-Choudhury et al., *EMBO J.*, 6:1733-1739(1987)). In this regard, the foreign sequences described above inserted into adenovirus may be further inserted into adenoviral wild-type genome.

The adenovirus may be of any of the 42 different known
20 serotypes or subgroups A-F. Adenovirus type 5 of subgroup C is the most preferred starting material for constructing the adenoviral gene delivery system of this invention. A great deal of biochemical and genetic information about adenovirus type 5 is known.

25 The foreign genes delivered by the present adenoviral gene delivery system are episomal, and therefore, have low genotoxicity to host cells. Therefore, gene therapy using the adenoviral gene delivery system of this invention may be considerably safe.

ii. Retrovirus

Retroviruses capable of carrying relatively large exogenous genes have been used as viral gene delivery vectors in the
 5 senses that they integrate their genome into a host genome and have broad host spectrum.

In order to construct a retroviral vector, the relaxin-encoding nucleotide sequences and the nucleotide sequence of interest to be transferred are inserted into the viral genome
 10 in the place of certain viral sequences to produce a replication-defective virus. To produce virions, a packaging cell line containing the gag, pol and env genes but without the LTR (long terminal repeat) and Ψ components is constructed (Mann et al., *Cell*, 33:153-159(1983)). When a recombinant
 15 plasmid containing the relaxin-encoding sequence, the nucleotide sequence of interest, LTR and Ψ is introduced into this cell line, the Ψ sequence allows the RNA transcript of the recombinant plasmid to be packaged into viral particles, which are then secreted into the culture media (Nicolas and
 20 Rubinstein "Retroviral vectors," In: *Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses*, Rodriguez and Denhardt (eds.), Stoneham: Butterworth, 494-513(1988)). The media containing the recombinant retroviruses is then collected, optionally concentrated and used for gene delivery.

25

A successful gene transfer using the second-generation retroviral vector has been reported. Kasahara et al. (*Science*, 266:1373-1376(1994)) prepared variants of moloney murine leukemia virus in which the EPO (erythropoietin) sequence is

inserted in the place of the envelope region, consequently, producing chimeric proteins having novel binding properties. Likely, the present gene delivery system can be constructed in accordance with the construction strategies for the second-
5 generation retroviral vector.

iii. AAV vector

Adeno-associated viruses are capable of infecting non-dividing cells and various types of cells, making them useful
10 in constructing the gene delivery system of this invention. The detailed descriptions for use and preparation of AAV vector are found in U.S. Pat. No. 5,139,941 and 4,797,368.

Research results for AAV as gene delivery systems are disclosed in LaFace et al, *Virology*, 162:483486(1988), Zhou et al., *Exp. Hematol.* (NY), 21:928-933(1993), Walsh et al, *J. Clin. Invest.*, 94:1440-1448(1994) and Flotte et al., *Gene Therapy*, 2:29-37(1995). Recently, an AAV vector has been approved for
15 Phase I human trials for the treatment of cystic fibrosis.

Typically, a recombinant AAV virus is made by cotransfecting
20 a plasmid containing the gene of interest (i.e., relaxin gene and nucleotide sequence of interest to be delivered) flanked by the two AAV terminal repeats (McLaughlin et al., 1988; Samulski et al., 1989) and an expression plasmid containing the wild type AAV coding sequences without the terminal repeats (McCarty
25 et al., *J. Virol.*, 65:2936-2945(1991)).

iv. Other viral vectors

Other viral vectors may be employed as a gene delivery system in the present invention. Vectors derived from viruses

such as vaccinia virus (Puhlmann M. et al., *Human Gene Therapy* 10:649-657(1999); Ridgeway, "Mammalian expression vectors," In: *Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses*. Rodriguez and Denhardt, eds. Stoneham: Butterworth, 467-
 5 492(1988); Baichwal and Sugden, "Vectors for gene transfer derived from animal DNA viruses: Transient and stable expression of transferred genes," In: Kucherlapati R, ed. *Gene transfer*. New York: Plenum Press, 117-148(1986) and Coupar et al., *Gene*, 68:1-10(1988)), lentivirus (Wang G. et al., *J. Clin.*
 10 *Invest.* 104(11):R55-62(1999)) and herpes simplex virus (Chamber R., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 92:1411-1415(1995)) may be used in the present delivery systems for transferring both the relaxin gene and nucleotide sequence of interest into cells.

15 v. Liposome

Liposomes are formed spontaneously when phospholipids are suspended in an excess of aqueous medium. Liposome-mediated nucleic acid delivery has been very successful as described in Nicolau and Sene, *Biochim. Biophys. Acta*, 721:185-190(1982) and
 20 Nicolau et al., *Methods Enzymol.*, 149:157-176(1987). Example of commercially accessible reagents for transfecting animal cells using liposomes includes Lipofectamine (Gibco BRL). Liposomes entrapping the relaxin gene and nucleotide sequence of interest interact with cells by mechanism such as endocytosis,
 25 adsorption and fusion and then transfer the sequences into cells.

In another aspect of this invention, there is provided a method for delivery a gene, which comprises contacting the gene

delivery system of this invention as described hereinabove to a biosample containing cells.

Where the present gene delivery system is constructed on the basis of viral vector construction, the contacting is performed
5 as conventional infection methods known in the art. The infection of hosts using viral vectors is well described in the above-cited publications.

Where the present gene delivery system is a naked recombinant DNA molecule or plasmid, the relaxin-encoding
10 sequence and nucleotide sequence to be delivered are introduced into cells by microinjection (Capecchi, M.R., *Cell*, 22:479(1980) and Harland and Weintraub, *J. Cell Biol.* 101:1094-1099(1985)), calcium phosphate co-precipitation (Graham, F.L. et al., *Virology*, 52:456(1973) and Chen and Okayama, *Mol. Cell.*
15 *Biol.* 7:2745-2752(1987)), electroporation (Neumann, E. et al., *EMBO J.*, 1:841(1982) and Tur-Kaspa et al., *Mol. Cell Biol.*, 6:716-718(1986)), liposome-mediated transfection (Wong, T.K. et al., *Gene*, 10:87(1980) and Nicolau and Sene, *Biochim. Biophys. Acta*, 721:185-190(1982); and Nicolau et al., *Methods Enzymol.*,
20 149:157-176(1987)), DEAE-dextran treatment (Gopal, *Mol. Cell Biol.*, 5:1188-1190(1985)), and particle bombardment (Yang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87:9568-9572(1990)).

In still another aspect of this invention, there is provided
25 a recombinant adenovirus, which comprises an adenoviral ITR (inverted terminal repeat) nucleotide sequence and a relaxin-encoding nucleotide sequence; wherein a relaxin protein expressed enhances a penetration potency of the recombinant adenovirus into a tumor tissue and apoptosis of a tumor cell

infected with the recombinant adenovirus.

In the recombinant adenovirus of this invention, the relaxin protein expressed increases significantly a penetration potency of the recombinant adenovirus into a tumor tissue and apoptosis
5 of a tumor cell infected with the recombinant adenovirus, making the therapeutic efficacy of the adenovirus considerably increased.

A small portion of adenoviral genome is known to be necessary as cis elements (Tooza, *J. Molecular biology of DNA*
10 *Tumor viruses*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.(1981)), allowing substitution of large pieces of adenoviral DNA with foreign sequences, particularly together with the use of suitable cell lines such as 293. In this context, the recombinant adenovirus comprises the
15 adenoviral ITR sequence as an essential sequence as well as the relaxin-encoding nucleotide sequence.

It is preferred that the relaxin-encoding nucleotide sequence is inserted into either the deleted E1 region (E1A region and/or E1B region, preferably, E1B region) or the
20 deleted E3 region, more preferably, the deleted E3 region. The nucleotide sequence of interest to be delivered (e.g., cytokine genes, immuno-costimulatory factor genes, apoptotic genes and tumor suppressor genes) is inserted into the recombinant adenovirus, preferably into either the deleted E1 region (E1A
25 region and/or E1B region, preferably, E1B region) or the deleted E3 region, more preferably, the deleted E1 region (E1A region and/or E1B region, most preferably, E1B region) Furthermore, the inserted sequences may be incorporated into the deleted E4 region.

In nature, adenovirus can package approximately 105% of the wild-type genome, providing capacity for about 2 extra kb of DNA (Ghosh-Choudhury et al., *EMBO J.*, 6:1733-1739(1987)). In this regard, the foreign sequences described above inserted
5 into adenovirus may be further inserted into adenoviral wild-type genome.

According to a preferred embodiment, the recombinant adenovirus of this invention comprises the inactivated E1B 19 gene, inactivated E1B 55 gene or inactivated E1B 19/E1B 55 gene. The
10 term "inactivation" in conjunction with genes used herein refers to conditions to render transcription and/or translation of genes to occur non-functionally, thereby the correct function of proteins encoded genes cannot be elicited. For example, the inactivated E1B 19 gene is a gene incapable of
15 producing the functional E1B 19 kDa protein by mutation (substitution, addition, and partial and whole deletion). The defect E1B 19 gives rise to the increase in apoptotic incidence and the defect E1B 55 makes a recombinant adenovirus tumor-specific (see Korean Pat. Appln. No. 10-2002-0023760).

20 According to a preferred embodiment, the recombinant adenovirus of this invention comprises the active E1A gene. The adenovirus carrying the active E1A gene is replication-competent. More preferably, the recombinant adenovirus of this invention comprises the inactivated E1B 19/E1B 55 gene and
25 active E1A gene. Most preferably, the recombinant adenovirus comprises the inactivated E1B 19/E1B 55 gene, the active E1A gene and the relaxin-encoding sequence in place of deleted E3 region.

According to the most preferred embodiment, the recombinant

adenovirus of this invention comprises a structure of "ITR-E1A-
ΔE1B-promoter-relaxin gene-poly A sequence" in which the
promoter-relaxin gene-poly A sequence is present in the deleted
E3 region.

5 The recombinant adenovirus of this invention shows highly
improved transduction (penetration) efficiency into tumors
compared to conventional anti-tumoric adenoviruses and
apoptosis potency as well. These improved efficacies are
ascribed mainly to relaxin to effectively degrade extracellular
10 matrix and increase apoptotic potential. Consequently, the
recombinant adenovirus of this invention exhibits dramatically
enhanced oncolytic effect.

Tumor tissues are not agglomerates composed solely of tumor
cells but complicated structure further comprising blood vessel
15 and normal cells. In particular, the connective tissue in tumor
tissues is generally rigid and forms tight extracellular matrix
surrounding tumor cells. Therefore, anticancer drugs as well as
viruses cannot penetrate effectively into tumors, so that they
generally exhibit a limited anti-tumor effect. Such obstacles
20 can be overcome using the recombinant adenovirus of this
invention containing the relaxin gene.

As demonstrated in Examples described hereunder, the
adenovirus of this invention with the inserted relaxin gene
actively spreads even into the center of tumor spheroids as
25 well as their surface. For *in vivo* tumor tissues, the relaxin-
expressing adenovirus of this invention spreads widely and
remotely to the distal site from injection site (needle track).
The improvement in the transduction efficiency accomplished by
the relaxin-expressing adenovirus is obvious even to be easily

differentiated with naked eyes. It could be appreciated that the improved transduction efficiency is very considerable compared to about 2-3 fold increase in transduction efficiency of pretreatment of proteases such as collagenase/dispase or
5 trypsin, elastase to degrade elasitin or hyaluronidase to degrade extracellular matrix.

The enhanced spreading effect within tissues by relaxin can greatly increase anti-tumor efficacy of tumor-specific oncolytic adenovirus. This improved anti-tumor efficacy may be
10 exhibited in replication incompetent adenoviruses as well as replication competent adenoviruses. The enhanced ability of adenoviruses to induce apoptosis by relaxin is surprising and non-anticipated.

15 In further aspect of this invention, there is provided a pharmaceutical anti-tumor composition for treating a cancer, which comprises (a) a therapeutically effective amount of the recombinant adenovirus described previously; and (b) a pharmaceutically acceptable carrier.

20 The recombinant adenovirus as an active ingredient in the pharmaceutical composition is the adenovirus of the present invention described hereinabove and therefore the above descriptions can be adapted to the recombinant adenovirus of the pharmaceutical composition. Accordingly, the common
25 descriptions between them are omitted in order to avoid undue redundancy leading to the complexity of this specification.

To effectively elicit anti-tumor effect by recombinant adenoviruses, it is necessary that viruses proliferate and spread to neighboring cells faster than the growth rate of

cancer cells to induce oncolytic effect. In addition, a successful cancer-gene therapy using adenoviruses requires enhanced safety as well as high therapeutic benefit. The relaxin-expressing adenovirus of this invention increases both
5 viral spreading and apoptosis to exhibit significantly increased anti-tumor effect. In particular, the recombinant adenovirus of this invention having deleted E1B 55 gene shows excellent tumor-specificity in cytotoxicity. For this reason, the relaxin-expressing adenovirus of this invention allows to
10 decrease a dosage for cancer therapy, reducing significantly toxicity to normal cells and undesirable immune reactions *in vivo*

Since the recombinant adenovirus of this invention has oncolytic effect to a wide variety of tumor cells, the
15 pharmaceutical composition of this invention is useful in treating tumor-related diseases, including stomach cancer, lung cancer, breast cancer, ovarian cancer, liver cancer, bronchogenic cancer, nasopharyngeal cancer, laryngeal cancer, pancreatic cancer, bladder cancer, colon cancer, and uterine
20 cervical cancer. The term "treatment" as used herein, refers to (i) prevention of tumorigenesis; (ii) suppression and curing of tumor-related diseases or disorders by eradicating tumor cells; and (iii) alleviation of tumor-related diseases or disorders by eradicating tumor cells. Therefore, the term "therapeutically
25 effective amount" as used herein means an amount sufficient to achieve the pharmaceutical effect described above.

The pharmaceutically acceptable carrier contained in the pharmaceutical composition of the present invention, which is commonly used in pharmaceutical formulations, but is not

limited to, includes lactose, dextrose, sucrose, sorbitol, mannitol, starch, rubber arable, potassium phosphate, arginate, gelatin, potassium silicate, microcrystalline cellulose, polyvinylpyrrolidone, cellulose, water, syrups, methyl
5 cellulose, methylhydroxy benzoate, propylhydroxy benzoate, talc, magnesium stearate, and mineral oils. The pharmaceutical composition according to the present invention may further include a lubricant, a humectant, a sweetener, a flavoring agent, an emulsifier, a suspending agent, and a preservative.

10 The pharmaceutical composition according to the present invention may be administered via the routes used commonly in gene therapy, and preferably, administered parenterally, i.e., by intravenous, intraperitoneal, intramuscular, subcutaneous, or local administration. For example, the pharmaceutical
15 composition may be administered intraperitoneally to treat ovarian cancer and intravenously to treat liver cancer, directly injected to visible tumor mass to treat breast cancer, directly injected to enema to treat colon cancer, and directly injected to a catheter to treat bladder cancer.

20 A suitable dosage amount of the pharmaceutical composition of the present invention may vary depending on pharmaceutical formulation methods, administration methods, the patient's age, body weight, sex, pathogenic state, diet, administration time, administration route, an excretion rate and sensitivity for a
25 used pharmaceutical composition, and physicians of ordinary skill in the art can determine an effective amount of the pharmaceutical composition for desired treatment. Generally, the pharmaceutical composition of the present invention comprises 1×10^5 - 1×10^{15} pfu/ml of a recombinant adenovirus,

and 1×10^{10} pfu of a recombinant adenovirus is typically injected once every other day over two weeks.

According to the conventional techniques known to those skilled in the art, the pharmaceutical composition comprising the recombinant adenovirus according to the present invention may be formulated with pharmaceutically acceptable carrier and/or vehicle as described above, finally providing several forms a unit dose form and a multi-dose form. Non-limiting examples of the formulations include, but not limited to, a solution, a suspension or an emulsion in oil or aqueous medium, an extract, an elixir, a powder, a granule, a tablet and a capsule, and may further comprise a dispersion agent or a stabilizer.

The pharmaceutical composition comprising the recombinant adenovirus according to the present invention may be utilized alone or in combination with typical chemotherapy or radiotherapy. Such combination therapy may be more effective in treating cancer. The chemotherapeutic agents useful for the combination therapy include cisplatin, carboplatin, procarbazine, mechlorethamine, cyclophosphamide, ifosfamide, melphalan, chlorambucil, bisulfan, nikosourea, dactinomycin, daunorubicin, doxorubicin, bleomycin, plicomycin, mitomycin, etoposide, tamoxifen, taxol, transplatinum, 5-fluorouracil, vincristin, vinblastin and methotrexate. Examples of the radiotherapy useful for the combination therapy include X-ray illumination and γ -ray illumination.

In another aspect of this invention, there is provided a pharmaceutical composition for improving a penetration potency of a medicament into a tissue, which comprises (a) a relaxin

protein to improve the penetration potency of the pharmaceutical composition into the tissue; and (b) a pharmaceutically acceptable carrier.

5 The relaxin protein contained the pharmaceutical composition of this invention may be obtained from natural sources and conventional DNA recombinant technologies. Furthermore, its fragments are encompassed in the present invention unless they are inactive in the degradation of extracellular matrix.

10 The pharmaceutical composition may be administered prior to or simultaneously with administration of certain medicament. In addition, the pharmaceutical composition may further comprise a medicament. The pharmaceutical composition of this invention degrades extracellular matrix surrounding tissues to be targeted by medicaments to enhance tissue penetration of medicaments, 15 increasing significantly a pharmacological efficacy of medicaments.

The pharmaceutical acceptable carrier, administration route and method, and formulation for the present pharmaceutical composition are described with referring to descriptions for 20 the pharmaceutical anti-tumor composition of this invention as discussed previously. In particular, the present pharmaceutical composition is preferably administered parenterally, e.g., by intravenous, intraperitoneal, intramuscular, subcutaneous or transdermal and local (e.g., direct injection into brain or 25 breast tumor mass) administration. Generally, the pharmaceutical composition of this invention may be administered in a dosage of 0.0001-100 mg/kg.

The medicament to show improved tissue penetration by the pharmaceutical composition of this invention includes chemical

drugs and biodrugs, preferably, drugs whose tissue penetration is deteriorated by extracellular matrix, e.g., anticancer drugs.

In still another aspect of this invention, there is provided
5 a pharmaceutical composition for treating a disease or condition associated with accumulation of excess extracellular matrix, which comprises (a) a therapeutically effective amount of a relaxin protein or a gene delivery system comprising a relaxin-encoding nucleotide sequence; and (b) a
10 pharmaceutically acceptable carrier.

The pharmaceutical composition of this invention degrades effectively extracellular matrix surrounding tissues to have a therapeutic efficacy on a disease or condition associated with accumulation or deposition of excess extracellular matrix. The
15 phrase "accumulation of excess extracellular matrix" means excessive deposition of components of extracellular matrix such as collagen, laminin, fibronectin and proteoglycan to damage tissues or organs, finally causing fibrosis.

The diseases or conditions associated with excessive
20 accumulation of extracellular matrix to be treated by the present pharmaceutical composition are fibrosis-related diseases, including, , but not limited to, scar, liver cirrhosis, pulmonary fibrosis, glomerular nephritis, adult or acute dyspnea, hepatic fibrosis, renal fibrosis, myocardial
25 fibrogenesis following myocardial infarction, fibrocystic disorder, fibrotic cancer, veno-occlusive syndrome and renal stroma fibrosis.

Both scar caused by wound, burn or operation and excessive

scar such as keloid may be treated with the pharmaceutical composition of this invention.

The gene delivery system comprising a relaxin-encoding nucleotide sequence can be described with referring to
5 descriptions of the gene delivery system of this invention discussed hereinabove. The relaxin protein contained the pharmaceutical composition of this invention may be obtained from natural sources and conventional DNA recombinant technologies. Furthermore, its fragments are encompassed in the
10 present invention unless they are inactive in the degradation of extracellular matrix.

The pharmaceutical acceptable carrier, administration route and method, and formulation for the present pharmaceutical composition are described with referring to descriptions for
15 the pharmaceutical anti-tumor composition of this invention as discussed previously. In particular, the present pharmaceutical composition is most preferably administered by transdermal administration. The formulations suitable in the present pharmaceutical composition include ointment, gel, cream,
20 solution, spray, patch and lotion. Generally, the pharmaceutical composition of this invention may be administered in a dosage of 0.0001-100 mg/kg.

The present invention provides a novel gene delivery system
25 and recombinant adenovirus comprising the relaxin-encoding sequence, a gene delivering method using the gene delivery system, a pharmaceutical anti-tumor composition comprising the recombinant adenovirus, a pharmaceutical composition characterized by improved tissue penetration potency and a

pharmaceutical composition for treating a disease or disorder associated with accumulation of excess extracellular matrix. According to the present invention, relaxin is responsible for the improvement in transduction efficacy and apoptotic ability to increase tumor cell killing potential dramatically.

The following specific examples are intended to be illustrative of the invention and should not be construed as limiting the scope of the invention as defined by appended claims.

EXAMPLES

MATERIALS and METHODS

Cell lines and cell culture

Cell lines for experiments were human brain cancer cell lines (U343, U87MG), cervical cancer cell line (C33A), liver cancer cell line (Hep3B), lung cancer cell line (A549) and 293 cell line carrying the early gene of adenovirus, E1 region available from the American Type Culture Collection (ATCC). All cell lines were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco BRL) supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco BRL), penicillin and streptomycin and maintained at 37°C under 5% CO₂ atmosphere.

Generation and titration of recombinant adenoviruses

To generate E1/E3-gene deleted replication-incompetent adenoviruses expressing relaxin and lac Z as a reporter, we first constructed pdl-LacZ viral vector with lac Z gene at the deleted E1 region using vmdl324Bst (gifted from Dr. Verca,

University of Fribourgh, Switzerland; Heider, H. et al.,
Biotechniques, 28(2):260-265, 268-270(2000). For preparing this
 vector, the pcDNA-hygro-LacZ plasmid (Invitrogen, Carlsbad, CA,
 USA) was digested with *HindIII* and *NaeI* to isolate the CMV
 5 promoter, lacZ gene and polA and the isolated three sequences
 were inserted into the E1 adenoviral shuttle vector, pΔE1splA
 to prepare pΔE1splA/CMV-LacZ shuttle vector. The prepared
 pΔE1splA/CMV-LacZ shuttle vector was digested with *XmnI* and
 cotransformed with vmd1324Bst adenovirus linearized by *BstBI*
 10 into *E. coli* BJ5183 (Dr. Verca, University of Fribourgh,
 Switzerland) to induce homologous recombination, obtaining pdl-
 LacZ adenovirus.

For constructing relaxin-expressing adenoviruses, pDNR-LIB-
 RLX (ATCC, #MGC-14599) was digested with *SalI-HindIII* to obtain
 15 a 1 kb DNA fragment which in turn was subcloned into the pCA14
 vector (Microbix, Ontario, Canada), generating a pCA14-RLX. The
 nucleotide sequences of relaxin used in the Example is
 published under GenBank accession No. BC005956. Then, a CMV-
 RLX-polA expression cassette was excised from the pCA14-RLX
 20 using *BglIII* and subsequently inserted into the adenovirus E3
 shuttle vector pSP72ΔE3 (Promega, Madison, WI, USA) to
 construct a pSP72ΔE3-cRLX E3 shuttle vector. The constructed
 pSP72ΔE3-cRLX E3 shuttle vector was linearized with *XmnI* and
 then cotransformed with the pdl-LacZ into *E. coli* BJ5183 (Dr.
 25 Verca, University of Fribourgh, Switzerland) to induce
 homologous recombination, producing a dl-LacZ-RLX (or dl-Z-RLX)
 adenovirus vector (Fig. 1). The dl-Z-RLX adenovirus was
 deposited in the Korean Culture Center of Microorganisms (KCCM)
 with the Accession No. KCCM-10567 on March 19, 2004.

To construct a replication-competent adenovirus expressing the relaxin gene, the pSP72 Δ E3-cRLX E3 shuttle vector prepared above was linearized with *Xmn*I and cotransformed into *E. coli* BJ5183 together with the E1B 19 kDa/E1B 55 kDa-deleted pAd Δ E1B19/55 adenovirus vector linearized with *Spe*I (KFCC 11288) for homologous recombination, generating a Ad- Δ E1B-RLX adenovirus vector (Fig. 1). The Ad- Δ E1B-RLX adenovirus was deposited in the Korean Culture Center of Microorganisms (KCCM) with the Accession No. KCCM-10566 on March 19, 2004.

10 In Fig. 1, Ψ denotes a sequence comprising ITR (inverted terminal repeat) and the package signal, Ad represents adenovirus, CMV represents the CMV promoter, Pol A is the poly A sequence and IX represents a gene encoding the IX protein.

To verify the respective homologous recombinants, the plasmid DNA was digested with *Hind*III and the digestion pattern was analyzed. The proper homologous recombinant adenoviral plasmid DNA was digested with *Pac*I and transfected into 293 cells to generate dl-lacZ-RLX and Ad- Δ E1B-RLX adenoviruses. All viruses were propagated in 293 cells and their titration was performed according to limited dilution or plaque assay (Hitt, M. et. al., *Construction and propagation of human adenovirus vectors. Cell biology: a laboratory handbook*. New York: Academic Press Inc, 479-490(1994)), followed by concentration using CsCl gradient and purification.

25 As a control virus, an Ad- Δ E1B (with deleted E1B region) was constructed and produced using the pCA14 as E1 shuttle vector according to procedures described previously.

Examination of relaxin expression pattern in dl-LacZ-RLX and Ad-ΔE1B19/55-RLX

Human cervical cancer cell line C33A was infected with dl-LacZ-RLX or Ad-ΔE1B-RLX, or dl-LacZ or Ad-ΔE1B19 adenovirus (KFCC-11288) at MOI (multiplicity of infection) of 1-50 and medium used was recovered after 24 hr. The expression of relaxin was analyzed using the ELISA kit (Immune diagnostik, Benshem, Germany) according to the manufacturer's protocol.

10 Evaluation on spreading and penetration of dl-LacZ-RLX in tumor spheroid

U343, U87MG, C33A and A549 xenografts were established subcutaneously by injecting cells into the abdomen of 6- to 8-week-old nude mice and once the tumors reached to 150-200 mm³ in volume, fresh tumor tissue was extracted at surgery. 1-2 mm fragments of the tumor tissue were dissected. These explants were plated individually on 0.75% agarose-coated plates and cultured in DMEM (Gibco BRL) supplemented with 5% FBS (Gibco BRL) and penicillin/streptomycin (Gibco BRL) at 37°C under 5% CO₂ atmosphere. Medium was renewed once every week. Prior to infection with adenoviruses, spheroids with diameter of 2 mm were transferred to 0.75% agarose-coated 48-well plates and 150 μl of DMEM (containing 5% FBS) were added, after which viruses were added at 1x10⁶, 1x 10⁷, or 1 x 10⁸ PFU. 48-hr later, the medium was aspirated and spheroids were fixed in a fixation solution for X-gal staining. The surface of X-gal stained spheroids was observed under a stereoscopic microscope. For the observation on penetration of adenovirus into tumor spheroid, the X-gal stained tumor spheroids were embedded in O.C.T.

compound (Sakura Finetec, Torrance, CA) and snap frozen. 8 μ m frozen section was then placed onto gelatin-coated slide glass.

Evaluation on spreading and penetration of dl-LacZ-RLX in vivo

5 U343, U87MG, C33A, Hep3B and A549 xenografts were established subcutaneously by injecting cells into the abdomen of 6- to 8-week-old nude mice and once the tumors reached to 150-200 mm³ in volume, mice were randomized into two groups and dl-LacZ-RLX adenovirus at 5×10^7 - 1×10^8 PFU in 50 μ l was
10 intratumorally injected into the tumors three times. Three days after the last injection, animals were sacrificed and tumors were taken for virus distribution, after which they were fixed in 4% paraformaldehyde at 4°C for 4-8 hr and dehydrated in 30% sucrose solution for 12 hr. The dehydrated tumor tissues were
15 frozen in O.C.T. compound and dissected to sections with 8 μ m thickness, followed by placing them onto gelatin-coated slide glass for X-gal staining.

Cytopathic effect (CPE) of Ad- Δ E1B-RLX virus

20 To evaluate the oncolytic activity of relaxin-expressing adenoviruses, human tumor cell lines (U343, U87MG, C33A, Hep3B and A549) were plated onto 24-well plates and then infected with Ad- Δ E1, Ad- Δ E1B, or Ad- Δ E1B-RLX adenovirus at MOIs 0.1-10. At the time that cells infected with any one of the viruses
25 exhibited complete cell lysis at an MOI of 0.1-0.5, the dead cells were washed out and cells on the plate were then stained with 0.5% crystal violet in 50% methanol.

Plaque development assay

To observe the change of plaque size over relaxin expression, 3×10^5 Hep3B cells were placed to 6-well plates and infected with Ad- Δ E1B or Ad- Δ E1B-RLX adenovirus at 3 MOI after one day of cell growth. After 4 hr of incubation, the infected cells were overlaid with agarose-DMEM mixture of 2 x DMEM (containing 10% FBS and penicillin/streptomycin) at 37°C and 1.4% agarose at 42°C and then incubated at 37°C in 5% CO₂ incubator. Following about 10 days of incubation, agarose overlay was removed after soaking with 10% TCA (trichloroacetic acid) for 30 minutes and the remaining cells were stained with 0.5% crystal violet in 50% methanol.

Flow cytometry analysis for apoptosis potential

To examine apoptosis induced by relaxin, human tumor cell lines, U343, U87MG, C33A, Hep3B and A549, were introduced to 25T culture flasks and 24 hr later, infected with Ad- Δ E1B or Ad- Δ E1B-RLX adenovirus at an MOI of 0.5-5. Cells were treated with 0.1-1 μ M CPT-11 (camptothecin) as a positive control and treated with PBS as a negative control. After 48 hr, 72 hr and 96 hr of infection, the infected cells were collected and fixed in 70% ethanol at 4°C for 24 hr. Following the fixation, the cells were incubated with a mixture of PI (propidium iodide, 50 μ g/ μ l) and RNase for 15 min and the analysis by flow cytometry was performed. In addition, to examine early apoptosis induced by relaxin, several human tumor cell lines were infected with Ad- Δ E1B or Ad- Δ E1B-RLX adenovirus as described above. The infected cells were collected and then processed for Annexin V/PI dual staining according to manufacturer's instruction in the ApoAlert V-FITC apoptosis kit (Clontech, Palo Alto, CA),

followed by flow cytometric analysis.

TUNEL assay

U343 (5×10^4), U87MG (5×10^4), C33A (5×10^5), Hep3B (4×10^5), and A549 (5×10^4) cells were plated onto a chamber slide and then infected with adenovirus at an MOI of 0.2-20. Following 24 hr and 48 hr of infection, medium was removed and TUNNEL assay was carried out according to the manufacturer's instruction of ApopTag kit (Intergen, Purchase, NY). For color development, cells were incubated with peroxidase-conjugated streptavidin and then diaminobenzidine (DAKO, Carpinteria, CA). At the time that color of cells became brown, cells were counterstained with 0.5% methyl green for 10 min and observed under microscope in more than 4 selected fields. The ratio of stained cells to total cells was calculated.

Anti-tumor effects of relaxin-expressing adenovirus in vivo

To assess the effect of Ad- Δ E1B-RLX adenovirus on the growth of human tumor spheroid formed in nude mice, tumors were implanted on the abdomen of 6- to 8-week-old nude mice by subcutaneous injection of 1×10^7 cancer cells (U343, U87MG, C33A, Hep3B and A549). When tumors reached to a range of 50-80 mm³, Ad- Δ E1B or Ad- Δ E1B-RLX at 5×10^7 - 5×10^8 PFU in PBS was administered intratumorally three times every other day and the growth pattern of tumors was observed. The volume of tumors was calculated with the major axis and minor axis measured using a caliper: volume = (minor axis mm)² x (major axis mm) x 0.523.

Observation of the change of tumor characteristics induced by

the administration of relaxin-expressing replication-competent adenovirus

When C33A tumor formed in the abdomen of nude mice reached to about a range of 50-80 mm³, Ad-ΔE1B or Ad-ΔE1B-RLX at 5 x 10⁷ PFU in PBS was administered intratumorally three times. Following 3 days of injection, the tumor tissues were extracted and their paraffin blocks were prepared. The blocks were cut into 4-μm slides and deparaffinized in xylene and then in graded alcohols (100%, 95%, 80% and 70%), followed by staining with hematoxylin and eosin. For the observation of distribution of collagen, a component of connective tissue, 4-μm paraffin-embedded slides were stained using boulin, hematoxylin and biebrich's scarlet acid fuchsin.

In addition, the immunohistochemistry staining for the hexon region of adenoviruses was carried out. The slides were deparaffinized as described above and incubated with the primary anti-adenoviral hexon antibody, AB1056F (Chemicon, Temecula, CA) and then with the secondary goat anti-rat IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA). The color development was performed using DAB (DAKO, Carpinteria, CA).

To observe the occurrence of apoptosis in tumors, TUNNEL assay was carried out according to the manufacturer's instruction of ApopTag kit (Intergen, Purchase, NY). For the color development, cells were incubated with peroxidase-conjugated streptavidin and then diaminobenzidine (DAKO, Carpinteria, CA). At the time that color of cells became brown, cells were counterstained with 0.5% methyl green for 10 min and observed under microscope.

Analysis of MMP Expression using Zymography

To observe changes of MMP (metalloproteinase) activities, U343 cells were plated in 75T culture and then incubated with PBS, Ad- Δ E1B or Ad- Δ E1B-RLX for 48 hr. Afterwards, the medium
5 was changed with DMEM not containing fetal bovine serum and then incubated for 24 hr. The medium was harvested and concentrated. 20 μ l aliquot was electrophoresed on a gelatin-gel. Then, the gel was subject to gelatin-degradation reaction at 37°C for 18 hr and stained with Coomassie blue for MMP2 and
10 MMP9 expression.

RESULTS

Construction of relaxin-expressing adenoviruses and expression pattern of relaxin

15 To visually evaluate the alteration of penetration efficiency into tissues depending on relaxin expression, replication-incompetent dl-LacZ-RLX adenoviruses expressing LacZ as a reporter were constructed. Furthermore, tumor-specific oncolytic Ad- Δ E1B-RLX adenovirus was constructed to
20 enhance the transduction efficiency of replication-competent adenovirus into tissues (Fig. 1). For assessing the relaxin expression pattern of adenoviruses constructed, a cervical cancer cell line, C33A was infected with dl-LacZ, dl-LacZ-RLX, Ad- Δ E1B or Ad- Δ E1B-RLX adenoviruses at various MOIs and media
25 were recovered for ELISA (Fig. 2). Cells infected with dl-LacZ as a negative control for replication-incompetent adenovirus and Ad- Δ E1B as a negative control for tumor-specific oncolytic adenovirus were revealed not to express relaxin, whereas those infected with dl-LacZ-RLX and Ad- Δ E1B-RLX showed the dose-

dependent expression of relaxin depending on the titer of adenoviruses administered.

Evaluation on the transduction efficiency of dl-LacZ-RLX

5 adenovirus to in vitro tumor tissue using tumor spheroids

To evaluate the transduction efficiency and tissue penetration of dl-LacZ-RLX to tumor spheroids, various human tumor cell lines were subcutaneously injected into nude mice and once the tumors reached to 150-200 mm³ in volume, fresh
10 tumor tissues was extracted. The tumor tissues extracted were dissected into 1-2 mm fragments and infected with adenoviruses at 1×10^6 , 1×10^7 , or 1×10^8 PFU. X-gal staining was carried out after 48 hr of infection. Compared to the treatment of 1×10^6 PFU dl-LacZ, the same dose of dl-LacZ-RLX showed stronger X-
15 gal staining on the surface of tumor spheroid. dl-LacZ-RLX at 1×10^7 and 1×10^8 PFU led to darker X-gal staining on the overall surface of tumor spheroid. To accurately investigate the penetration efficiency of adenoviruses into tumor spheroids, X-gal-stained tumor spheroids were sectioned for observation.
20 dl-LacZ at 1×10^6 , 1×10^7 or 1×10^8 PFU exhibited poor LacZ expression in tumor tissues and its spread was limited to the surface of tumor spheroids. In contrast, the same doses of dl-LacZ-RLX showed much higher LacZ expression level and its spread was extended to the inner part of tumor spheroids (Fig.
25 3). The results clearly demonstrate that in the three-dimensional structure of tumor spheroids, relaxin-expressing dl-LacZ-RLX adenovirus transduced and spread to the core of the spheroid with higher efficiency than the control vector, dl-LacZ.

Evaluation on the transduction efficiency of dl-LacZ-RLX adenovirus in tumor mass in vivo

In order to investigate whether the enhanced transduction efficiency and viral spread of dl-LacZ-RLX seen in tumor spheroids in vitro would lead to an increase in lacZ gene delivery to tumor mass in vivo, tumor xenograft models were used. dl-LacZ or dl-LacZ-RLX adenovirus at 5×10^7 or 1×10^8 PFU was intratumorally injected into the tumor mass formed in the abdomen of nude mice. Three days later, tumors were taken and sectioned for X-gal staining. While dl-LacZ exhibited the low level of LacZ expression and the stained region was restricted to the virus injection site, dl-LacZ-RLX showed much higher LacZ expression and the stained region was found to be widely spread to other regions than the virus injection site (Fig. 4). In particular, U87MG and C33A tumor mass transduced with dl-LacZ-RLX showed dark blue color ascribed to intensive LacZ expression throughout all the tumor tissues. These expression profiles address that the penetration and spreading of dl-LacZ-RLX in tumor mass in vivo is enhanced compared to dl-LacZ control virus not to express relaxin.

Assessment on tumor cell killing effect of relaxin-expressing oncolytic adenovirus

To reveal that the increase in penetration and spreading of relaxin-expressing adenovirus contributes to enhanced tumor cell killing effect of tumor-specific oncolytic adenoviruses, a CPE assay was carried out. Each of human tumor cell lines (U343, U87MG, C33A, Hep3B and A549) was infected with dl-LacZ

(negative control), Ad- Δ E1B or Ad- Δ E1B-RLX adenovirus at MOIs 0.1-10 and the resulted tumor cell killing effects were analyzed. As shown in Fig. 5, while the negative control, dl-LacZ elicited little or no cell killing effect in various tumor cell lines, Ad- Δ E1B-RLX exhibited about 2-10 fold higher tumoricidal effect than Ad- Δ E1B not to express relaxin. In particular, Ad- Δ E1B-RLX adenovirus showed about 10-fold higher tumoricidal effect than Ad- Δ E1B in Hep3B cell line, and Ad- Δ E1B-RLX showed about 5-fold higher tumoricidal effect than Ad- Δ E1B in U87MG, C33A and A549 cell lines. According to the results, it could be understood that the relaxin expression does not deteriorate a replication competency of adenoviruses and contributes to the dramatic increase in tumoricidal effect of adenoviruses.

15

Plaque formation of relaxin expressing oncolytic adenovirus

To visualize the effect of relaxin expression on the cytopathic ability and viral spread into surrounding cells, plaque formation in a solid medium containing agarose was compared. Hep3B cells were infected with Ad- Δ E1B or Ad- Δ E1B-RLX adenovirus at 3 MOI and plaque formation was then analyzed. As shown in Fig. 6, plaques were formed in shorter time for Hep3B cells infected with Ad- Δ E1B-RLX than those infected with Ad- Δ E1B. In addition, plaques formed in Hep3B cells infected with Ad- Δ E1B-RLX showed larger size than those in Hep3B cells infected with Ad- Δ E1B. More specifically, with Ad- Δ E1B, plaques were observed after 16 days post-infection, whereas plaques were formed as early as 4 days post-infection for Ad- Δ E1B-RLX. These results demonstrate that relaxin-expressing adenoviruses

lead to the formation of plaques in shorter period of time and much larger size owing to enhanced oncolytic activity and viral spread to surrounding cells.

5 Apoptosis induced by relaxin-expressing adenovirus

The replication incompetent adenovirus, dl-LacZ-RLX was revealed to induce the death of cells that were detached from the bottom of culture plates. Therefore, we examined whether relaxin expression is responsible for cytotoxic effect. Firstly,
10 to determine whether relaxin induces apoptosis, flow cytometric assay was carried out after PI staining for analyzing an increase rate of subG₁ cell population containing randomly fragmented DNAs due to apoptosis.

A representative of human tumor cell lines was infected with
15 Ad-ΔE1B or Ad-ΔE1B-RLX adenovirus and harvested after 48-96 hr post-infection for measuring an increase in subG₁ cell population (Fig. 7). CPT-11 was used as a positive control for the induction of apoptosis. For A549 cells, Ad-ΔE1B induced about 3.11% of subG₁ cell population and Ad-ΔE1B-RLX elicited
20 the significantly increased subG₁ cell population, 22.90%. Such increased subG₁ cell population was also observed in other cell lines (U343, U87MG, C33A and Hep3B).

Further, to accurately examine the effect of relaxin expression on cell killing potency, the progress of apoptosis
25 induced by Ad-ΔE1B-RLX was assessed by Annexin-V and PI dual staining. Annexin-V is used to detect the translocation of phosphatidylserin (PS) to the external membrane leaflet as an early marker for apoptosis, and PI is used to identify necrosis by binding to nuclear chromatin as a late marker for apoptosis.

Therefore, Annexin-V⁻/PI⁻, Annexin-V⁺/PI⁻ and PI⁺ represents healthy, apoptotic and necrotic cells, respectively.

Of the CPT-treated C33A cells, 57.10% (Annexin-V⁺/PI⁻) of the cells were apoptotic, while the cells infected with Ad-ΔE1B and
 5 Ad-ΔE1B-RLX showed 21.99% and 33.03% apoptotic rate, respectively, indicating that Ad-ΔE1B-RLX adenovirus induces enhanced apoptosis rate compared to Ad-ΔE1B (Fig. 8). For other cell lines including U343, U87MG, Hep3B and A549, the relaxin-expressing adenovirus showed much higher apoptosis rate than
 10 Ad-ΔE1B adenovirus. In addition, the total of apoptosis and necrosis (Annexin-V⁺/PI⁻ and PI⁺) reflecting the entire cell death was elucidated to be much higher for Ad-ΔE1B-RLX than Ad-ΔE1B.

Collectively, these results urge us to reason that Ad-ΔE1B-
 15 RLX adenovirus elicits much higher rate of apoptosis than Ad-ΔE1B, so that the cell death occurs more frequently by Ad-ΔE1B-RLX than Ad-ΔE1B.

TUNNEL assay was performed for identifying DNA fragmentation
 20 as a characteristic of early apoptosis. It was shown in Fig. 9 that almost all the cells treated with CPT as a positive control were stained to dark brown, indicating the occurrence of active apoptosis. 32.5±12.5% of Ad-ΔE1B-infected U343 cells appeared light brown and 69.7±5.40% of Ad-ΔE1B-RLX-infected
 25 cells dark brown, demonstrating the higher potency of Ad-ΔE1B-RLX to induce apoptosis than Ad-ΔE1B (Table 1). Such increased apoptosis was also found in other tumor cell lines.

TABLE 1

Tumor cell line	Proportion of apoptotic cells (%)
-----------------	-----------------------------------

	PBS	CPT	Ad-ΔE1B	Ad-ΔE1B-RLX
U343	10.5±5.83	53.5±7.45	32.5±12.5	69.7±5.40
U87MG	2.5±1.11	83.0±29.29	16.5±5.21	77.0±17.98
C33A	5.65±3.29	60.1±25.41	45.2±7.61	79.8±20.51
Hep3B	1.65±0.61	71.2±15.73	38.5±2.65	69.7±15.64
A549	3.5±0.83	37.5±5.35	34.8±11.3	75.21±1.22

Evaluation on anti-tumor effect of relaxin-expressing oncolytic adenovirus in vivo

To investigate in vivo anti-tumor effect of relaxin-expressing Ad-ΔE1B-RLX, tumors xenografts formed in nude mice were infected three times every other day with Ad-ΔE1B or Ad-ΔE1B-RLX at 5×10^7 - 5×10^8 PFU and the growth pattern of tumors was observed. For human brain tumor U87MG, the negative control PBS resulted in the considerable growth of tumor to 1089±167.22 mm³, whereas Ad-ΔE1B and Ad-ΔE1B-RLX led to the significant suppression of tumor growth to 115.70±19.60 mm³ and 55.63±28.42 mm³, respectively (Fig. 10).

In other words, tumors treated with Ad-ΔE1B or Ad-ΔE1B-RLX adenovirus showed 10-30 fold higher anti-tumor effect than those treated with PBS. After 25 days post-treatment, all of 9 mice treated with PBS were dead. After 33 days post-infection, Ad-ΔE1B and Ad-ΔE1B-RLX adenoviruses led to the tumor volume of 399.68±96.95 mm³ and 64.51±36.73 mm³, respectively, reasoning that the relaxin-expressing adenovirus has stronger anti-tumor potency than Ad-ΔE1B. Surprisingly, Ad-ΔE1B-RLX adenovirus completely eradicated tumor in 2 mice of 7 mice at day 19 post-viral infection and wiped out tumor in 5 mice at day 41 post-infection. Also, the regrowth of tumor was not observed even

after 60 days post-infection.

To examine whether such excellent anti-tumor effect of Ad- Δ E1B-RLX is also true in other human tumor cell lines, the analysis of anti-tumor effects was carried out for C33A, A549, Hep3B and U343 xenografts. The groups administered with tumor-specific oncolytic Ad- Δ E1B or Ad- Δ E1B-RLX adenovirus showed more remarkable anti-tumor effect than those treated with PBS, as shown in Fig. 10. The volume of tumor mass was much smaller for tumors treated with the relaxin-expressing adenovirus than those treated with Ad- Δ E1B. These results indicate that relaxin expression dramatically increases anti-tumor effects. In particular, C33A bearing mice treated with PBS control exhibited an average tumor volume of $2252 \pm 392 \text{ mm}^3$ at day 32 post-treatment, as compared to Ad- Δ E1B and Ad- Δ E1B-RLX which reached an average tumor volume of 917 ± 354 and $77 \pm 27 \text{ mm}^3$, respectively in the same time period. In terms of regressions, at day 45 post-treatment, 25% of the mice exhibited complete regressions for Ad- Δ E1B-treated tumors as compared to 50% complete regressions seen in Ad- Δ E1B-RLX-treated mice.

The survival rate of tumor-bearing mice was examined for the relaxin-expressing adenovirus treatment (Fig. 11). For C33A tumor bearing mice, 80 days after the beginning of the treatment, 100% of the animals treated with Ad- Δ E1B-RLX were still viable, whereas only 50% of Ad- Δ E1B-treated mice were viable in the same time period. Furthermore, even after six months post-treatment, 50% of Ad- Δ E1B-RLX-treated animals were still completely tumor-free. Similarly, Ad- Δ E1B-RLX-induced survival benefits were obtained in all other xenograft models (U343, U87MG, Hep3B and A549) examined. In relative to each

other, tumor bearing mice treated with Ad- Δ E1B-RLX survived much longer than those treated with Ad- Δ E1B in all xenograft models examined. Throughout the course of the study, no systemic toxicity such as diarrhea, loss of weight, or cachexia was observed. These results demonstrate that Ad- Δ E1B-RLX can confer significant survival benefits and tumor reduction *in vivo*.

Change of tumor characteristics induced by relaxin-expressing replication-competent adenovirus

Human cervical tumor cell line C33A formed in the abdomen of nude mice was infected three times with Ad- Δ E1B or Ad- Δ E1B-RLX. Following 3 days of injection, the tumor tissues were extracted and stained with hematoxylin and eosin for histological characterization (Fig. 12). Necrotic lesions in Ad- Δ E1B-RLX-treated tumors were mainly found on the periphery of tumor mass, whereas those in Ad- Δ E1B-treated tumors were barely detectable, if any, found at the center of tumor mass.

Viral persistence and distribution within the tumor mass was then verified by immunohistochemistry using antibodies specific to adenoviral hexon protein. As shown in Fig. 12, Ad- Δ E1B-RLX adenovirus was detected mainly on the periphery of tumor that undergone necrosis. TUNNEL assay revealed that apoptosis occurred actively in the same region as necrosis. In contrast, Ad- Δ E1B induced necrosis at the center of tumor, if detectable.

Summarizing, it could be recognized that Ad- Δ E1B-RLX adenovirus replicates actively in the viral injection site, contributing to the induction of apoptosis and necrosis.

Investigation of collagen distribution in tumor mass using
Masson's trichrome staining

Human brain tumor cell line U343 formed in nude mice was injected three times with Ad- Δ E1B or Ad- Δ E1B-RLX. Following 3
5 days of injection, the tumor tissues were extracted and stained with Masson's trichrome to analyze the distribution of collagen (stained blue color), a major component of extracellular matrix. trichrome stain). Tumors treated with PBS or Ad- Δ E1B consisted of high content of collagen (blue staining). In marked contrast,
10 tumors treated with Ad- Δ E1B-RLX appeared to be devoid of collagen, indicating that relaxin expression dramatically reduced the collagen content within the tumor mass. Interestingly, tumors treated with Ad- Δ E1B-RLX were encapsulated by connective tissue, and blue-staining was only
15 found in the boundary between tumor and normal tissue (Fig. 13).

Investigation of MMP expression using zymography

To verify whether the decrease in extracellular matrix by relaxin is induced by MMP expression, the activities of MMP-2
20 and MMP-9 were analyzed using zymography. It was revealed that human brain tumor cells U343 infected with Ad- Δ E1B or Ad- Δ E1B-RLX show increased MMP-9 activities compared to those treated with PBS (Fig. 13 and Table 2). In particular, cells infected with Ad- Δ E1B-RLX show higher MMP-9 activities than those with
25 Ad- Δ E1B. Cells infected with viruses at an MOI of 5 show about 10.06 folds higher MMP-9 activities than control cells not treated. For MMP-2, cells infected with Ad- Δ E1B-RLX show higher MMP-2 activities than those with Ad- Δ E1B. Cells infected with viruses at an MOI of 5 show about 1.8 folds higher MMP-2

activities than control cells not treated.

TABLE 2

Analysis of band intensities in Fig. 13

MMP Type	Ad-ΔE1B (MOI)				Ad-ΔE1B-RLX (MOI)		
	0	1	3	5	1	3	5
MMP-9	1.00	2.33	1.68	1.69	3.61	7.79	10.06
MMP-2	1.00	1.54	1.07	1.18	1.68	1.75	1.80

5 [Effect of the Invention]

The present invention provides a novel gene delivery system and recombinant adenovirus comprising the relaxin-encoding sequence, a gene delivering method using the gene delivery system, a pharmaceutical anti-tumor composition comprising the recombinant adenovirus, a pharmaceutical composition characterized by improved tissue penetration potency and a pharmaceutical composition for treating a disease or disorder associated with accumulation of excess extracellular matrix. According to the present invention, relaxin is responsible for the improvement in transduction efficacy and apoptotic ability to increase tumor cell killing potential dramatically.

Having described a preferred embodiment of the present invention, it is to be understood that variants and modifications thereof falling within the spirit of the invention may become apparent to those skilled in this art, and the scope of this invention is to be determined by appended claims and their equivalents.

What is claimed is:

1. In a gene delivery system comprising a nucleotide sequence of interest to be delivered into a cell, the improvement which comprises a relaxin-encoding nucleotide sequence to enhance a transduction efficiency of the nucleotide sequence of interest
5 into the cell.
2. The gene delivery system according to claim 1, wherein the cell is a cell in a tissue composed of cells interconnected
10 each other by an extracellular matrix.
3. The gene delivery system according to claim 2, wherein the tissue is a tumor tissue.
- 15 4. The gene delivery system according to claim 1, wherein the gene delivery system is a plasmid, a recombinant adenovirus, adeno-associated virus (AAV), retrovirus, lentivirus, herpes simplex virus, vaccinia virus, a liposome or a neosome.
- 20 5. The gene delivery system according to claim 4, wherein the gene delivery system is a recombinant adenovirus.
6. The gene delivery system according to claim 1, wherein the recombinant adenovirus comprises a deleted E3 region and the
25 relaxin-encoding nucleotide sequence is inserted into the deleted E3 region.
7. A method for delivering a gene into cells, which comprises contacting the gene delivery system according to any one of

claims 1-6 to a biosample containing cells.

8. A recombinant adenovirus, which comprises an adenoviral ITR (inverted terminal repeat) nucleotide sequence and a relaxin-
5 encoding nucleotide sequence; wherein a relaxin protein expressed enhances a penetration potency of the recombinant adenovirus into a tumor tissue and apoptosis of a tumor cell infected with the recombinant adenovirus.

10 9. The recombinant adenovirus according to claim 8, wherein the recombinant adenovirus comprises a deleted E3 region and the relaxin-encoding nucleotide sequence is inserted into the deleted E3 region.

15 10. The recombinant adenovirus according to claim 8, wherein the recombinant adenovirus comprises an inactivated E1B 19 gene, an inactivated E1B 55 gene or an inactivated E1B 19/E1B 55 gene.

11. The recombinant adenovirus according to claim 8, wherein
20 the recombinant adenovirus comprises an active E1A gene.

12. A pharmaceutical anti-tumor composition for treating a cancer, which comprises (a) a therapeutically effective amount of the recombinant adenovirus according to any one of claims 8-
25 11; and (b) a pharmaceutically acceptable carrier.

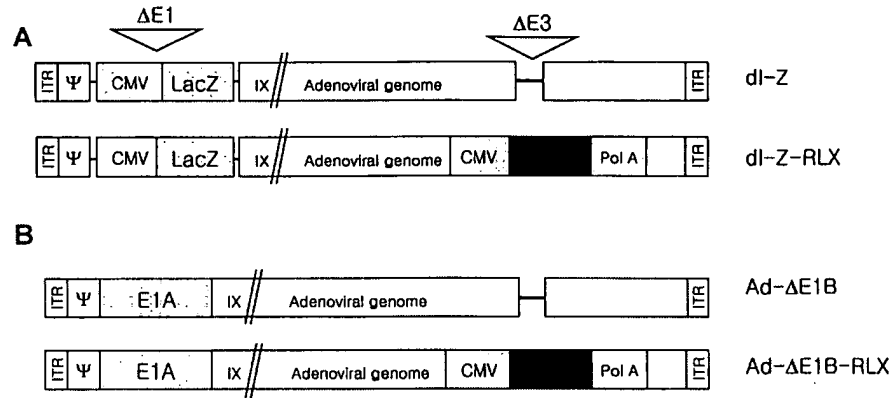
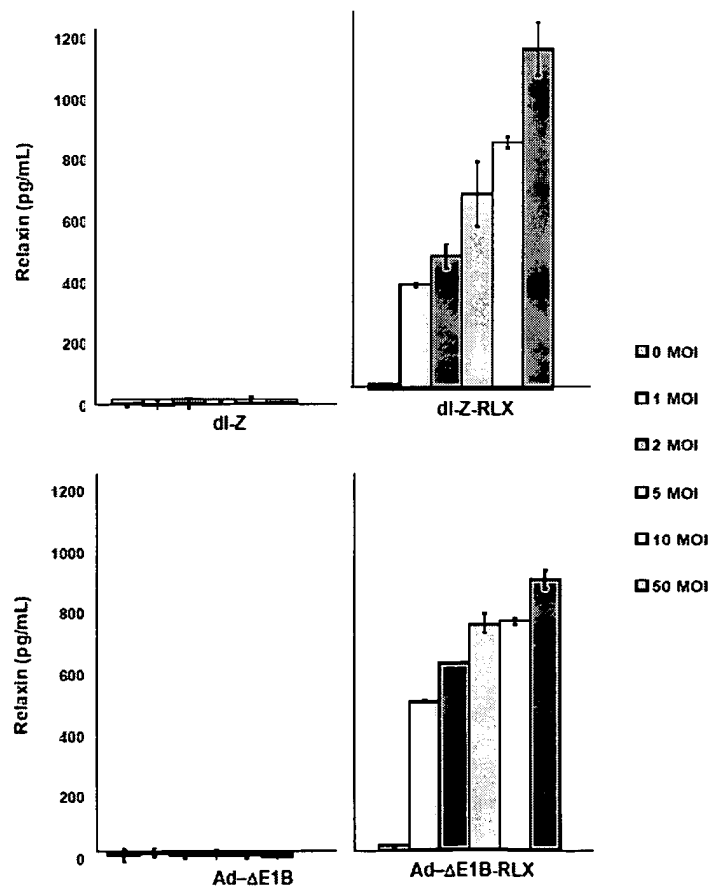
14. A pharmaceutical composition for improving a penetration potency of a medicament into a tissue, which comprises (a) a relaxin protein to improve the penetration potency of the

pharmaceutical composition into the tissue; and (b) a pharmaceutically acceptable carrier.

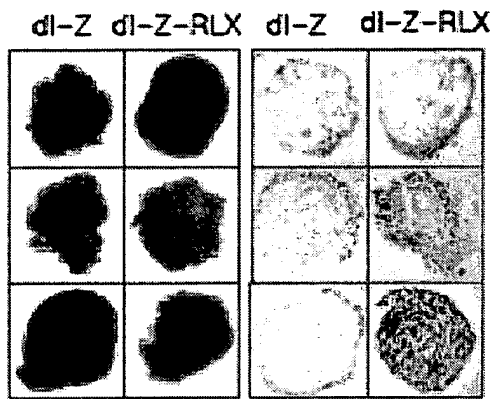
14. A pharmaceutical composition for treating a disease or
5 condition associated with accumulation of excess extracellular matrix, which comprises (a) a therapeutically effective amount of a relaxin protein or a gene delivery system comprising a relaxin-encoding nucleotide sequence; and (b) a pharmaceutically acceptable carrier.

10

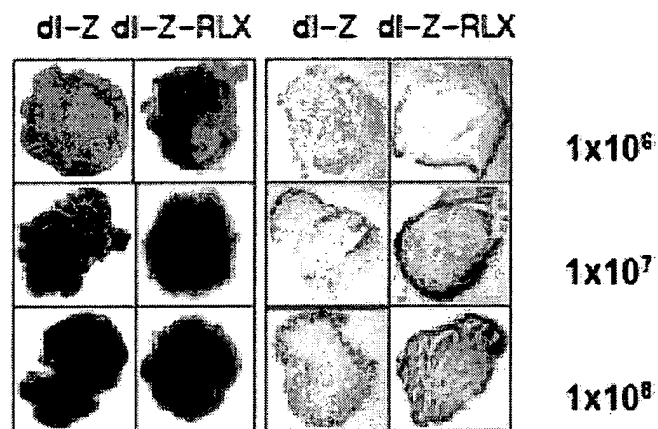
15. The pharmaceutical composition according to claim 14, wherein the a disease or condition associated with accumulation of excess extracellular matrix is scar, liver cirrhosis, pulmonary fibrosis, glomerular nephritis, adult or acute
15 dyspnea, hepatic fibrosis, renal fibrosis, myocardial fibrogenesis following myocardial infarction, fibrocystic disorder, fibrotic cancer, veno-occlusive syndrome or renal stroma fibrosis.

[Figures]**[Fig. 1]**5 **[Fig. 2]**

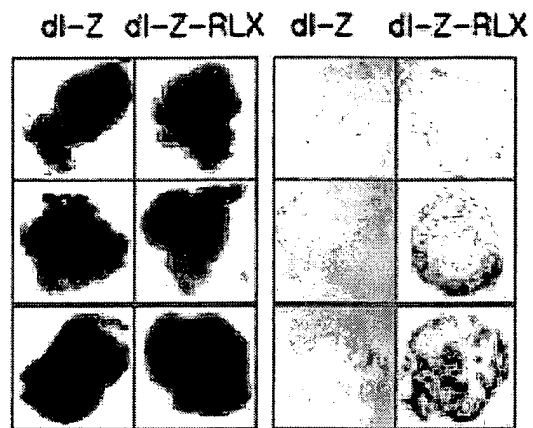
[Fig. 3a]

U343

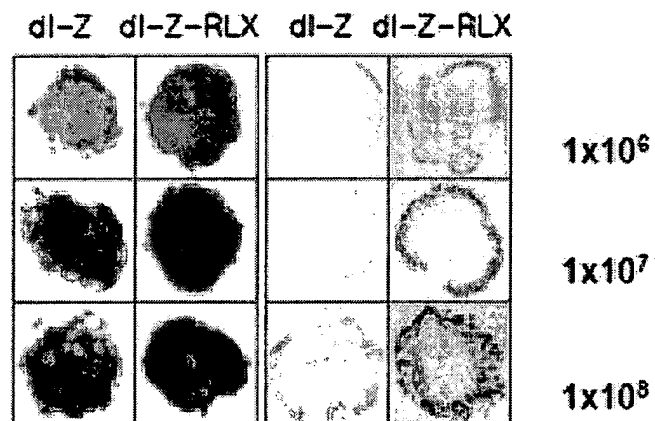
[Fig. 3b]

U87MG

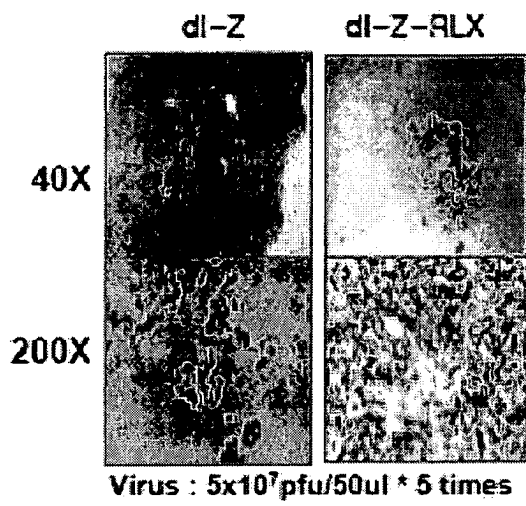
[Fig. 3c]

C33A

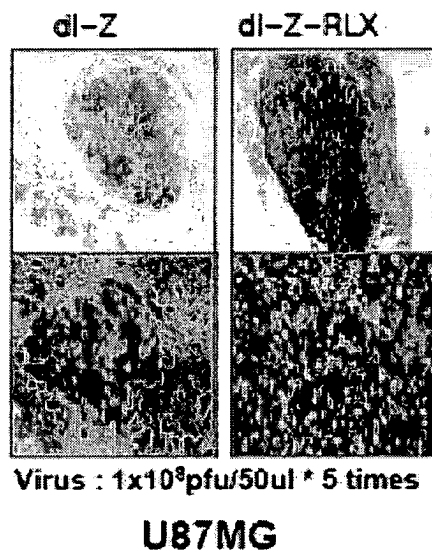
[Fig. 3d]

A549

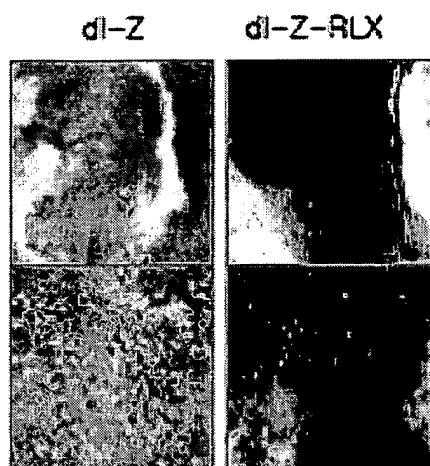
[Fig. 4a]



[Fig. 4b]



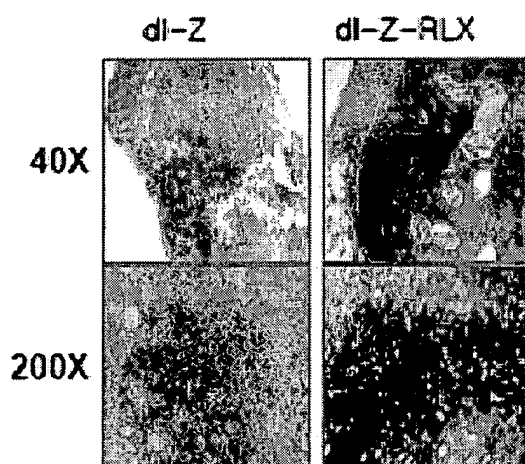
[Fig. 4c]



Virus : 5×10^7 pfu/50ul * 5 times

C33A

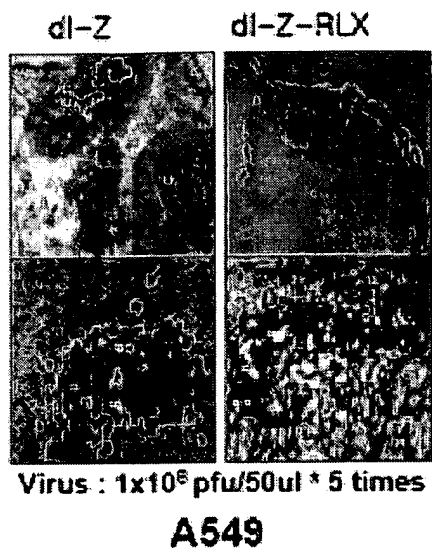
[Fig. 4d]



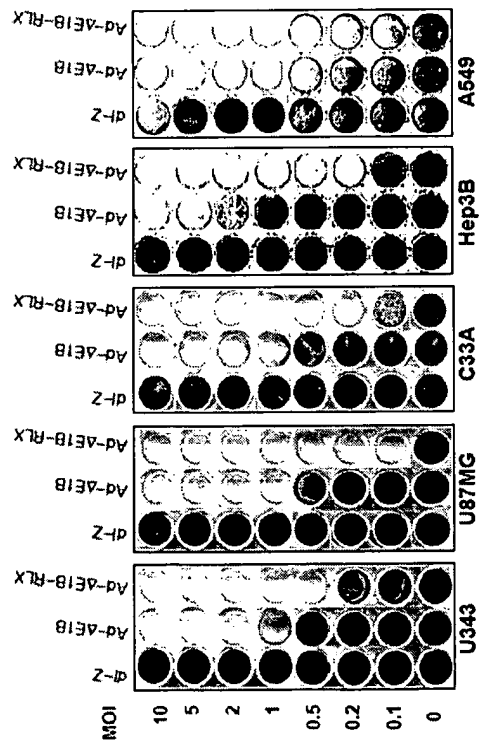
Virus : 1×10^8 pfu/50ul * 5 times

Hep3B

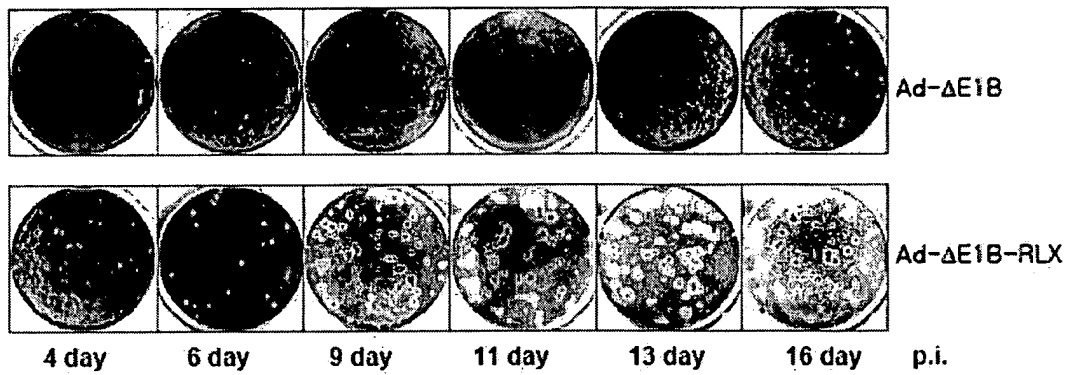
[Fig. 4e]



[Fig. 5]

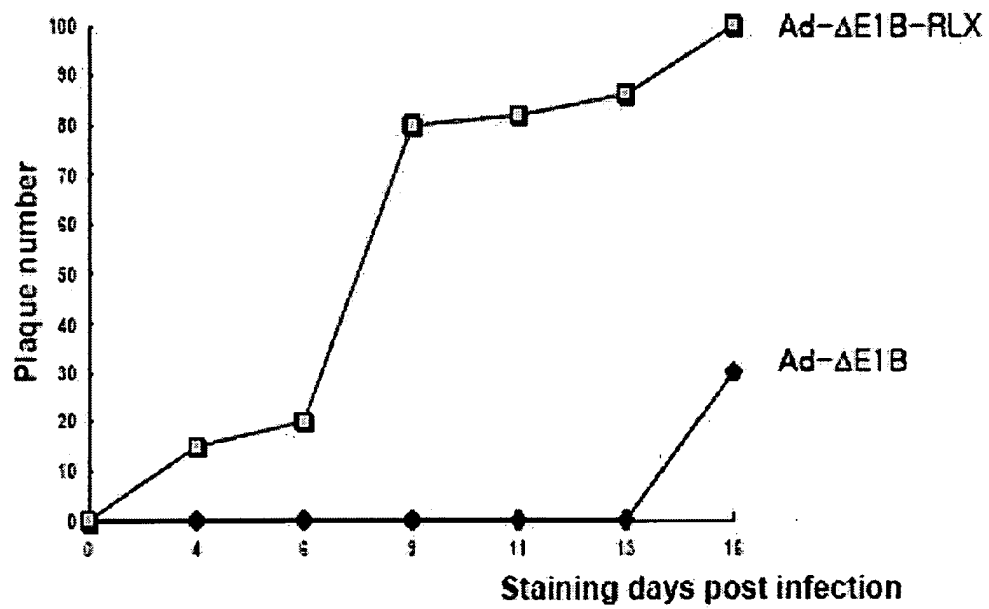


[Fig. 6a]



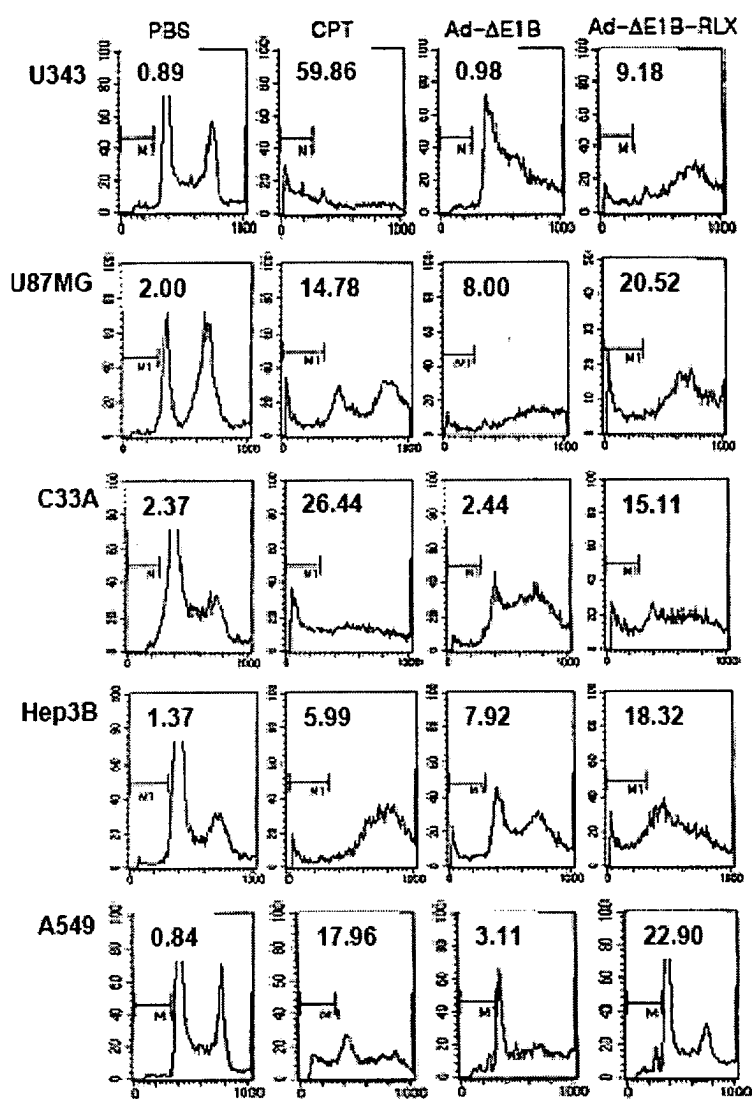
5

[Fig. 6b]

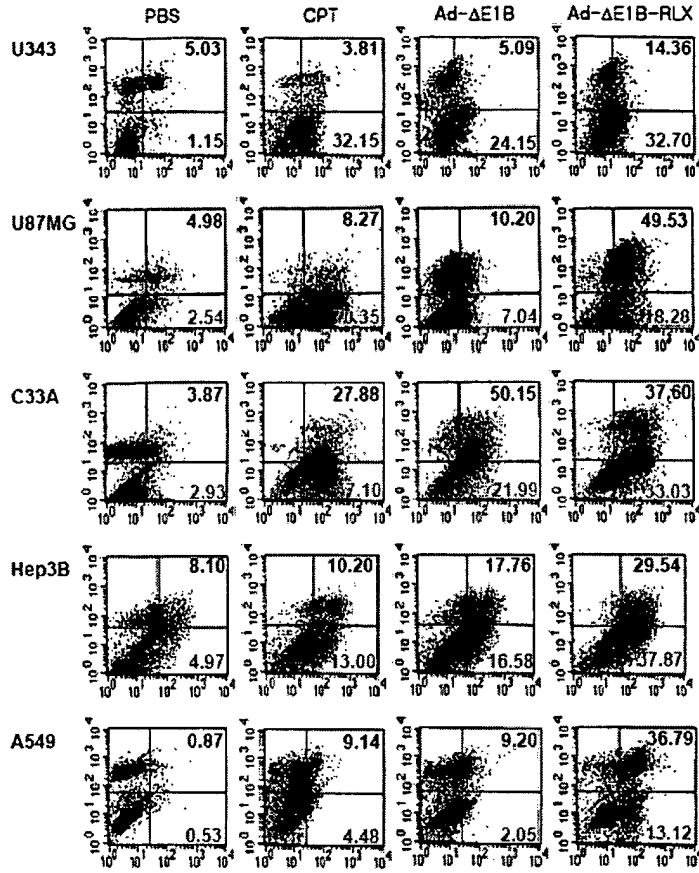


10

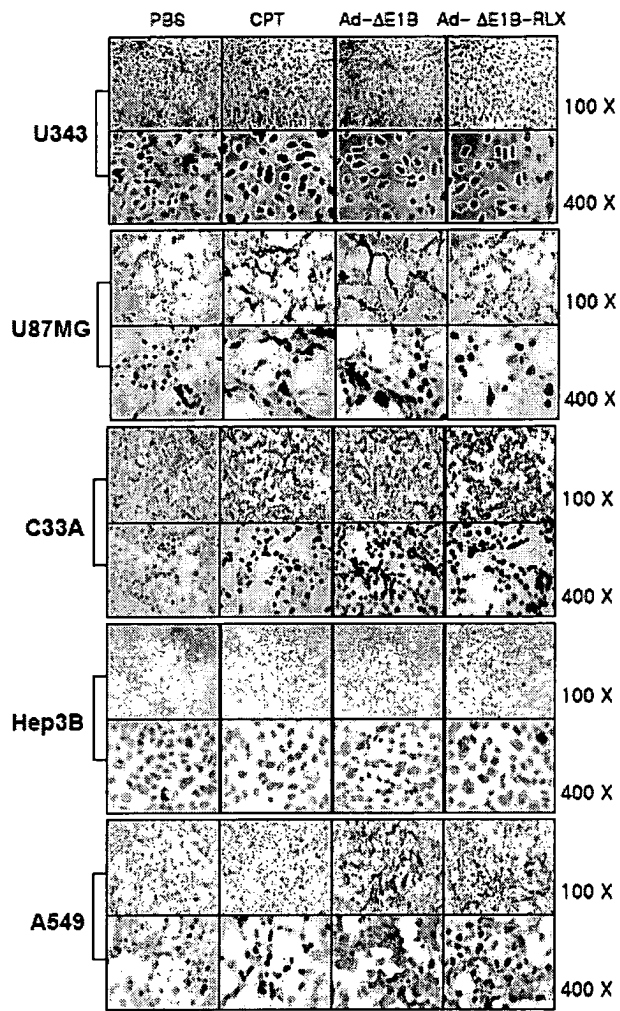
[Fig. 7]



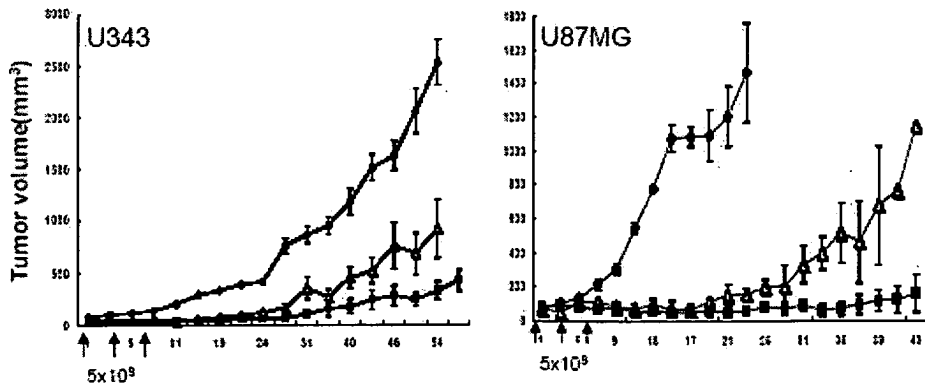
[Fig. 8]



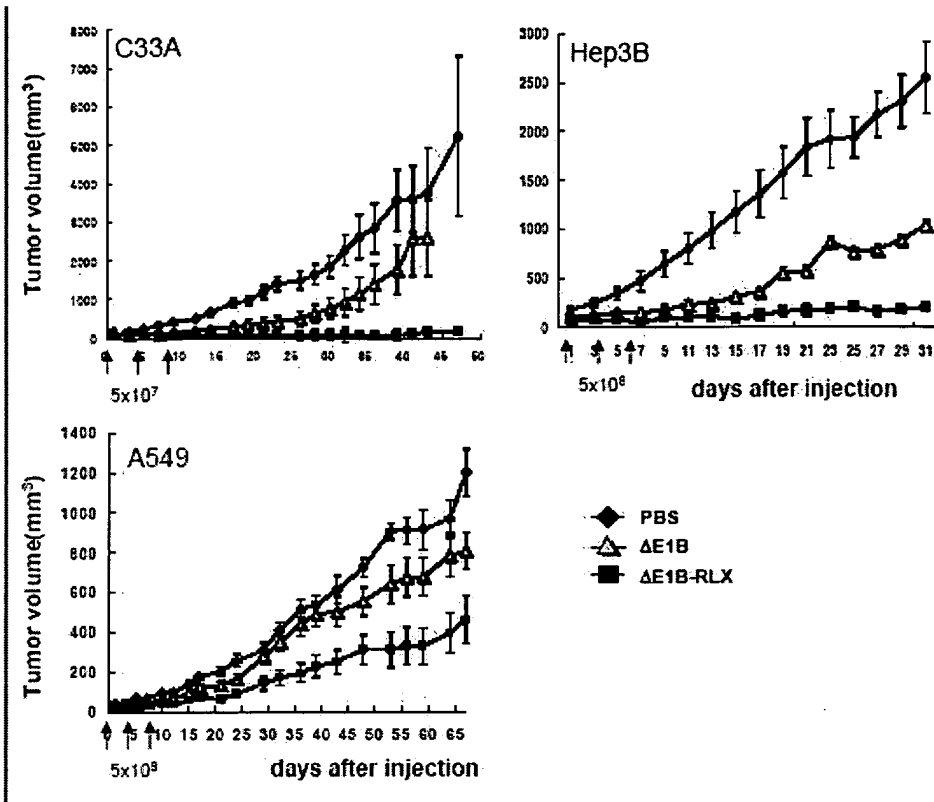
[Fig. 9]

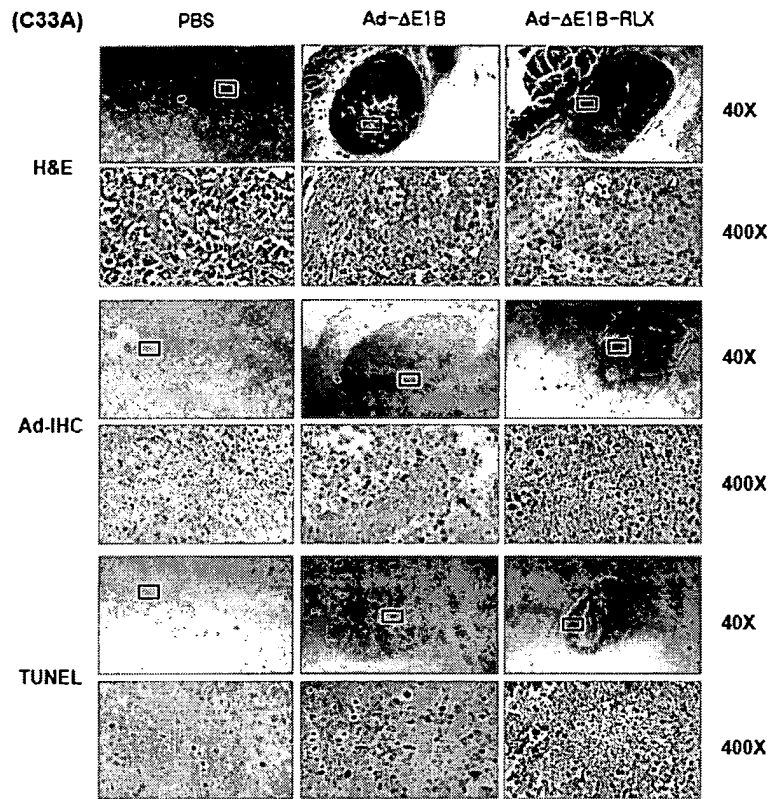


[Fig. 10a]

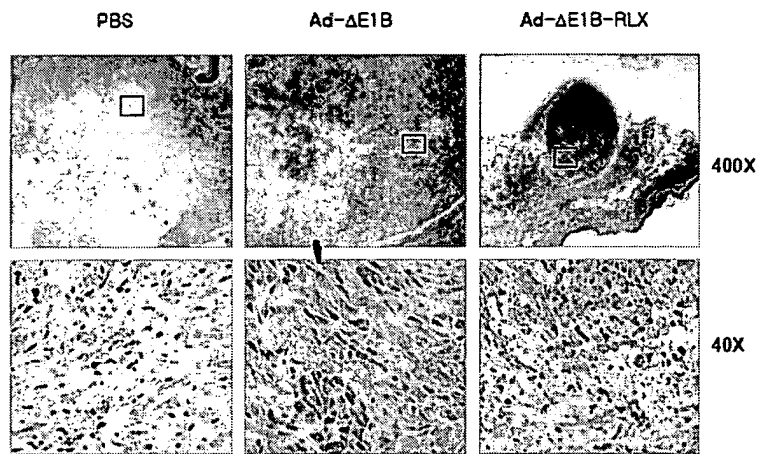


[Fig. 10b]



[Fig. 11]

[Fig. 12]



[Fig. 13]

